UNTERSUCHUNG ÜBER EINE 1-DIJODTYROSIN DEJODIERENDE AKTIVITÄT IM BLUTPLASMA

Maximilian Freiherr du Prel

1968

AUS DER KINDERKLINIK IM DR. VON HAUNER'SCHEN KINDERSPITAL
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. med. K. BETKE

UNTERSUCHUNG ÜBER EINE 1-DIJODTYROSIN DEJODIERENDE AKTIVITÄT IM BLUTPLASMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Freiherr du Prel

aus München

München 1968

LEIDIG-Druck, 8 München 2, Dachauerstr. 46/I, Tel. 592124

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. D. KNORR
Mitberichterstatter:	Professor Dr. K. BETKE
Dekan:	Professor Dr. F. MARGUTH

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Oktober 1968

Meiner Mutter Ilse Rose Lefebvre und
meinem Stiefvater Jean-Baptiste Lefebvre
in großer Dankbarkeit gewidmet

UNIV.
LEIDEN.

DANKSAGE

Für das Überlassen des Themas und für die große und sehr geduldige Hilfe während der Ausführung dieser Arbeit bin ich Herrn Privatdozent Dr. D. KNORR, Oberarzt an der Kinderklinik im Dr. von Hauner'schen Kinderspital der Universität München, sehr verpflichtet. Hiermit möchte ich Herrn Dr. KNORR an erster Stelle meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

Bei Herrn Privatdozent Dr. K.W. FREY, Oberarzt und wiss. Oberassistent am Institut und an der Poliklinik für physikalische Therapie und Röntgenologie der Universität München, bedanke ich mich für die sehr wertvollen Auskünfte über Erkrankungen des Jodstoffwechsels sowie für die große Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

Dem hochgeachteten Herrn Professor Dr. A. WISKOTT, bis 1967 Direktor der Universitäts-Kinderklinik und dem jetzigen Direktor, Herrn Professor Dr. K. BETKE, schulde ich respektvollen Dank für die Möglichkeit der Durchführung meiner Untersuchungen an der Universitäts-Kinderklinik.

Ebenso gebührt mein aufrichtiger Dank Herrn Professor Dr. H. von BRAUNBEHRENS, Direktor des Instituts und der Poliklinik für physikalische Therapie und Röntgenologie (Riederinstitut) der Universität München, für die freundliche Überlassung der Geräte und Räume zur Messung der Radioaktivität sowie für das mir zur Verfügung gestellte Natrium-Jodid ^{131}.

Herrn Dr. phil. nat. E. BUNDE, Dipl.-Physiker, Oberkonservator am Institut für physikalische Therapie und Röntgenologie der Universität München, bin ich ganz besonders zu Dank verpflichtet für die wertvollen Erklärungen physikalischer Fragen und für die stets freundlich gewährten Hilfestellungen an den Geräten zur Messung der Radioaktivität.

Herrn Privatdozent Dr. D. PETTE, wiss. Rat am Physiologisch-Chem. Institut der Universität München sowie Herrn Dr. O. BUTENANDT, wiss. Assistent an der Universitäts-Kinderklinik, bin ich sehr dankbar für

den mir immer freundlich gewährten Rat beim Auftreten von Fragen betreffs der Handhabung von Enzymen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau B. BLIESCH, medizinal-technische Leiterin des Steroidlabors der Universitäts-Kinderklinik, bedanken, die mir in stets sehr freundlicher Weise über die zahlreichen Schwierigkeiten geholfen hat, die so leicht einen Laborneuling entmutigen können.

Der Firma HÖCHST AG, Frankfurt/Main, meinen verbindlichen Dank für die freundliche Überlassung von 1-DJ^{131}T zu Versuchszwecken.

Dieser Dank gebührt ebenfalls der Firma DEUTSCHE HOFFMANN LA ROCHE AG, Grenzbach, für die freundliche Überlassung von 1-DJT zu Versuchszwecken.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		9
A.	ZUSAMMENFASSUNG DER INFORMATIONEN ÜBER DEJODASEN, DIE AUS DEN BISHER VERÖFFENTLICHTEN BERICHTEN ERHALTEN WERDEN KONNTEN	10
I.	Die Stellung der Dejodasen im Jodstoffwechsel und deren Bedeutung	10
II.	Die Vererbung des Jodtyrosindejodasenmangels	13
III.	Der Vorgang der 1-Dijodtyrosindeshalogenisation	14
IV.	Die bekannten Jodtyrosindejodasen	14
V.	Die bekannten Thyroxindejodasen	20
B.	ANGABEN ZUR VERSUCHSANORDNUNG	22
I.	Das verwendete Sephadex und der Vorgang bei der Fraktionierung	22
II.	Das optimale pH zur Gelfiltration	25
III.	Herstellung der Pufferlösung	28
IV.	Das Gerät zur Messung der Radioaktivität	28
V.	Die pro Versuch verwendete Radioaktivität	28
VI.	Serum- und Plasmaherkunft	29
VII.	Die Inkubation	29
VIII.	Das verwendete 1-Dijodtyrosin	29
IX.	Die pro Versuch verwendete 1-DJT-Menge	30
X.	Die pro Versuch benötigte Arbeitszeit	31

Seite

C. VORVERSUCHE 33

I. Die Stabilität der 1-DJ^{125}T-Lösung 33
II. Erkennung der Serum- bzw. Plasmafraktion 33
III. Erkennung der Jodidfraktion 33
IV. Erkennung der 1-DJT-Fraktion 34
V. Die Jodidbindung an Serum- bzw. Plasmaproteine 34
VI. Die 1-DJT-Bindung an Plasma- bzw. Serumproteine 35
VII. Dejodierung durch Schilddrüsengewebe 36
VIII. Inhibierung der Mikrosomendejodase 37
IX. Versuch zur Erfassung von Serumeiweißeinflüssen auf das Verhältnis von 1-DJT zu Jodid 39

D. DIE VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE 41

I. Versuchsanordnung bei der Serum- und Plasmauntersuchung 41
II. Untersuchung auf die von ROCHE und Mitarbeiter beschriebene Mikrosomendejodase 41
III. Untersuchung auf die von HARTMANN beschriebene Zellplasmadejodase 47
IV. Untersuchung von Blutplasma mit Flavinmononucleotid und Eisen^{2+}-Ionen als Zusätze 49
V. Untersuchung von Blutplasma mit Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Adenosintriphosphat als Zusätze 50
VI. Untersuchung von Blutplasma mit Flavin-Adenin-Dinucleotid als Zusatz 52
VII. Ermittlung der Fehlerbreite 53
VIII. Wiederfindung 55

BESPRECHUNG 56

ZUSAMMENFASSUNG 59

LITERATURVERZEICHNIS 60

EINLEITUNG

Seit ROCHE und Mitarbeiter 1952 zum ersten Mal ein dejodierendes Enzym in verschiedenen Geweben nachweisen konnten, ist dieses Enzym im Brennpunkt vieler Untersuchungen gestanden.

Die Dejodase wurde nicht nur in fast allen Organen nachgewiesen, sondern es wurde auch bald notwendig, zwischen Tyrosindejodasen und Thyroxindejodasen zu unterscheiden. In jeder dieser Gruppen sind bis heute zwei weitere Dejodasentypen beschrieben worden, die scheinbar verschiedene Wege der Metabolisierung des organischen Jods gehen und dabei verschiedene Coenzyme benötigen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Tyrosindejodasen, an deren Wichtigkeit seit den Berichten von HUTCHISON und MC GIRR 1954 für die Erhaltung der euthyreoten Stoffwechsellage nicht mehr zu zweifeln ist, sich im Blutplasma durch eine dejodierende Aktivität manifestieren. Es ist zweifellos von großer Bedeutung zu wissen, ob das enzymreiche, ubiquitär vorhandene Blutplasma einen Anteil an den Mechanismen hat, die zum Schutz vor Jodverlust und damit vor Hypothyreose und Kretinismus dienen.
Der positive Ausfall dieser Untersuchung würde einen neuen Weg zur klinischen Diagnostik des Jodtyrosindejodasemangels eröffnen. Dieser hätte folgende Vorteile:

1. die leichte Zugänglichkeit zum Blutplasma,
2. es ließe sich sicher ein einfaches Verfahren zur Routinediagnostik (z.B. Photometrie) erarbeiten, ein entsprechendes Coenzym zu dieser Dejodase wie NADP, NADH oder FAD vorausgesetzt.

A. ZUSAMMENFASSUNG DER INFORMATIONEN ÜBER DEJODASEN, DIE AUS DEN BISHER VERÖFFENTLICHTEN BERICHTEN ERHALTEN WERDEN KONNTEN

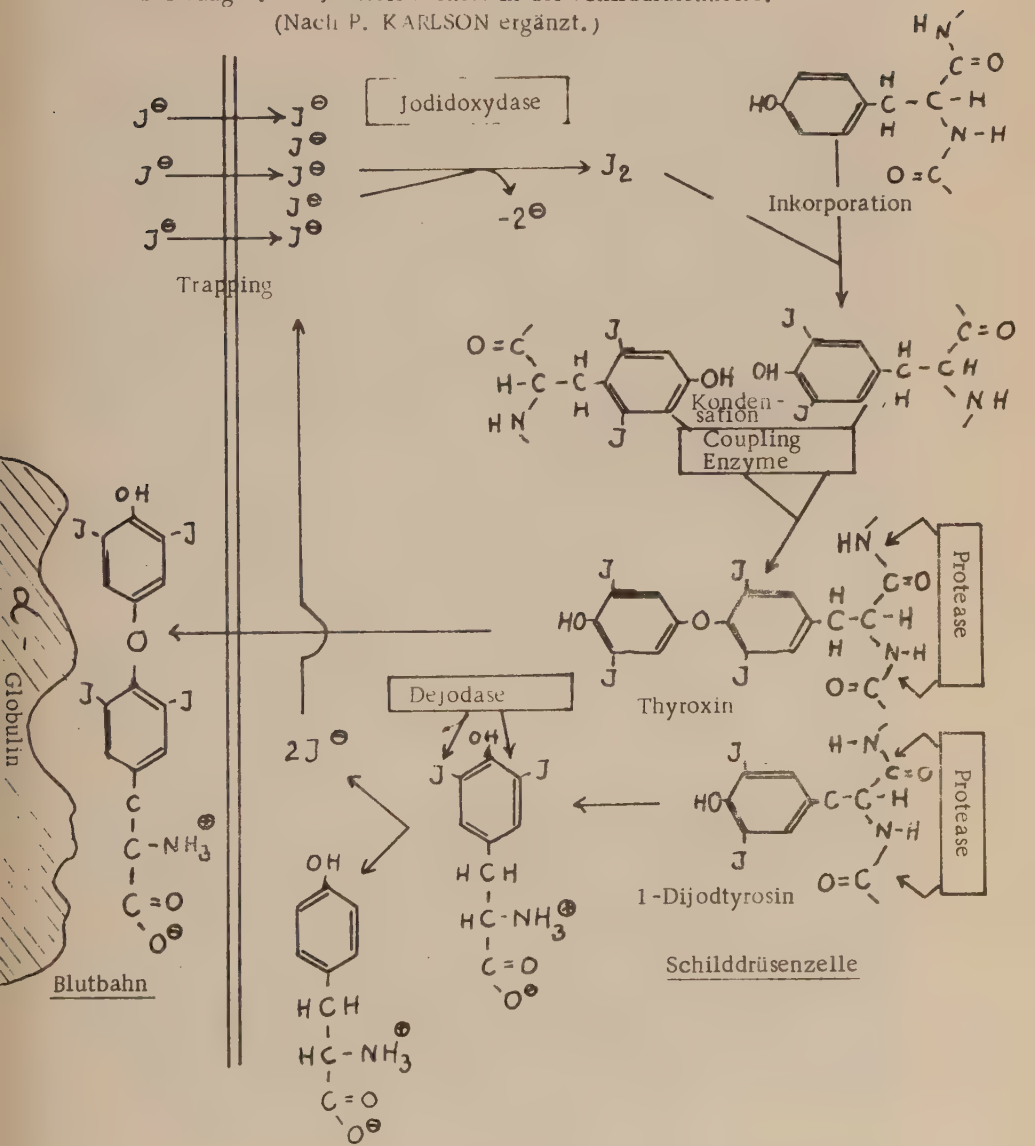
I. Die Stellung der Dejodasen im Jodstoffwechsel und deren Bedeutung

Das Thyroxin, das durch Jodmetabolisierung gebildete Hormon der Schilddrüse, ist eines der am längsten bekannten Hormone. Die Isolierung gelang KENDALL 1915, HARRINGTON ermittelte die Konstitution und synthetisierte es 1925. Die Biosynthese dieses Hormons verläuft folgendermaßen:

Jodionen werden durch den enzymatischen Vorgang des Trapping gegen ein Konzentrationsgefälle von den Zellen der Schilddrüsenazini aus dem Blut aufgenommen. Hier setzt das Enzym Jodoxydase ein und oxydiert das Jodid zu elementarem Jod. Dieses Jod wird sofort dem thyreoglobulingebundenen Tyrosin inkorporiert, so daß hier das thyreoglobulingebundene 3:5-1-Dijodtyrosin entsteht. Das Gerüst des Thyronins, die Diphenyläthergrundsubstanz des Thyroxins wird durch das Enzym Ligase (coupling enzyme) gebildet; dieses Enzym bewirkt die Kondensation von zwei an Thyreoglobulin gebundenen 3:5-1-Dijodtyrosin-Molekülen zum 3′:5′-3:5 Tetrajodthyronin, dem Thyroxin.
Das 3′-3:5 Trijodthyronin dürfte auf die gleiche Weise durch Kondensation eines 3-1-Monojodtyrosins mit einem 3:5 1-Dijodtyrosin entstehen (ROCHE et al. 1953). Da diese beiden Schilddrüsenhormone noch an Thyreoglobulin gebunden sind, müssen diese erst durch eine Protease von diesem Eiweiß abgespalten werden, um dann an das die Schilddrüse durchflutende Blut abgegeben zu werden. Diese Protease ist nicht so spezifisch, als daß sie nur Thyroxin und Trijodthyronin vom Thyreoglobulin befreien würde, sondern sie hydrolysiert auch laufend 3:5-1-DJT und 1-MJT ab, die dann als freie Jodtyrosine in die Blutbahn gelangen könnten. Diese Jodtyrosinflucht aus der Schilddrüse wird durch ein deshalogenisierendes Enzym, eine Dejodase, verhindert.

Die hier genannte Dejodase ist in der Lage, das Jod von diesen Jodtyrosinen abzuspalten, so daß Jodid und 1-Tyrosin entsteht (STANBURY und MORRIS 1958). Das hierbei freigewordene Jodid wird erneut zum Aufbau von Schilddrüsenhormonen verwendet. Auf diese Weise verhindert die Dejodase durch rasche Jodidabspaltung von den freien Jodtyrosinen den Austritt dieser hormonell unwirksamen Zwischenprodukte aus der Schilddrüse. Es können

Abbildung 1: Der Jodstoffwechsel in der Schilddrüsenzelle.
(Nach P. KARLSON ergänzt.)



also nur die aktiven Hormone Thyroxin und Trijodthyronin, auf die diese Dejodase keinen Einfluß hat, die Schilddrüse verlassen. Nach den Angaben von TONG und Mitarbeiter 1951 machen die freien Jodtyrosine einen Anteil von 1 - 2 % des Gesamtschilddrüsenjods aus.

Das an die Rezeptorzelle gelangte Schilddrüsenhormon wird nach Entfaltung seiner Wirkung durch spezifische Thyronindejodasen abgebaut (TATA 1960, DUNN und WERNER 1964, GALTON und INGBAR 1961). Dabei werden neben Tyrosin auch Jodtyrosine frei, die entweder von der zellständigen Jodtyrosindejodase abgebaut oder aber als solche an das Blut abgegeben werden. Diese Jodtyrosine sind schwach an Plasmaproteine gebunden (TONG et al. 1954) und können leicht durch die Niere ausgeschieden werden. Aber auch hier werden jodsparende Mechanismen manifest. Wie zuerst von HARTMANN 1944 und 1950 sowie von ALBERT und KEATING 1951 vermutet, von ROCHE et al. 1952 zuerst gefordert, dann von TONG et al. 1954 sowie von STANBURY, QUERIDO et al. 1956 bestätigt, werden die Jodtyrosine durch Organdejodasen in Leber, Darm und Niere deshalogeniert, und so dem drohenden Jodverlust ein Riegel vorgeschoben.

Dadurch erfüllt dieses Enzym eine wichtige Aufgabe im Jodstoffwechsel gesunder Menschen. Diese sind in der Lage, parenteral gegebenes 1-DJTfast vollständig zu dejodieren (STANBURY 1958 b). HUTCHISON und MC GIRR konnten 1954 an acht Mitgliedern einer wandernden schottischen Kesselflickerfamilie zeigen, daß die ganze parenteral gegebene 1-DJT-Menge im Harn unverändert ausgeschieden wurde. Es fehlte bei diesen Familienmitgliedern nicht nur die Dejodase des Schilddrüsenepithels, sondern auch die Dejodase im übrigen Körper. Selbst die stark hypertrophierte Schilddrüse war nicht in der Lage, den Jodverlust zu kompensieren und genügend Thyroxin zu bilden, so daß die Patienten neben einer Struma das Bild der schweren Hypothyreose mit Kretinismus boten (QUERIDO et al. 1956). Ein Dejodasemangel in der Schilddrüse allein bewirkt eine 1-Dijodtyrosinflucht in die Körperperipherie (STANBURY et al. 1955), wo die Dejodierung in Leber und Niere erfolgt; ein Teil, ca. 30 % (KUSAKABE et al. 1964), geht dennoch für den Körper verloren, so daß auch hier die Jodreserven schwinden. Dieser Jodverlust wird - auch in Gegenden, wo reichlich Jod aufgenommen werden kann - zur Hyperplasie der Schilddrüse und zur Hypothyreose führen (TONG et al. 1954, CHOUFOER et al. 1960).

II. Die Vererbung des Jodtyrosindejodasenmangels

Die endemische Hypothyreose ist das Ergebnis eines über Generationen andauernden schweren Jodmangels, der im allgemeinen mit einem Kropf vergesellschaftet ist.
Bei der nicht endemischen Hypothyreose ist ein Kropf nicht üblich, denn meist beruht dieser Zustand auf einem Defekt der embryonalen Schilddrüsenanlage (DORFF 1964), der sich in Form einer Athyreoidie oder ektopischen Schilddrüse äußert. Der Grund für diesen sporadischen Kretinismus ohne Kropf ist nicht bekannt, eine Vererbung nicht erkennbar.

Ein Kontrast zu diesem Typ ist die Hypothyreose, die als sporadischer Kretinismus mit Kropf beschrieben wird. Hier spielen Konsanguinität und Vererbung eine Rolle, obwohl dieser Typ auch vereinzelt auftreten kann. Dieser Typ der Hypothyreose entsteht nicht durch Mangel an Jod oder Schilddrüsengewebe, sondern ist dadurch bedingt, daß das Schilddrüsengewebe den Anforderungen des Körpers nicht genügt, auch bei maximaler Hypertrophie. Ursache ist ein Enzymmangel, der an verschiedenen Stellen der Thyroxinsynthese auftreten kann. Es werden folgende Typen unterschieden (JOSEPH et al. in BAMATTER, S. 177):

Typ 1: das Jodid wird nicht in organische Moleküle inkorporiert.
Typ 2: Anomalie der Jodtyrosindejodation.
Typ 3: die zwei an Thyreoglobulin gebundenen Jodtyrosine werden nicht kondensiert.
Typ 4: die fertigen Jodthyronine werden nicht vom Thyreoglobulin hydrolysiert.

Für den in dieser Arbeit beschriebenen Typ 2 haben HUTCHISON und MC GIRR 1956 durch Untersuchung der schon erwähnten wandernden schottischen Kesselflickerfamilie mit hoher Konsanguinität den Vererbungsmodus darstellen können. Auch KUSAKABE und MIYAKE bestätigten 1963 auf Grund eigener Untersuchungen die Vererbung durch ein autosomal recessives Gen. Bei heterozygoten Trägern dieses Gens wurde eine unterschwellige Dejodierungsschwäche festgestellt. Die Häufigkeit der weiblichen Merkmalsträgerinnen fiel den letztgenannten Autoren auf, und diese vermuteten 1964 daher, daß die weiblichen Hormone eine höhere Penetranz des Mangelgens verursachen könnten.

III. Der Vorgang der 1-Dijodtyrosin-Deshalogenisation

HARRINGTON und SALTER waren wahrscheinlich die ersten, die im Jahre 1930 durch Proteasen das 1-DJT zu deshalogenieren versuchten. Im selben Jahr führten FORSTER und GUTTMANN einen Versuch durch, in dem sie allerdings unphysiologische Mengen 1-DJT an Kaninchen verfütterten und stellten fest, daß vom verabreichten 1-DJT 10 % als Jodid und 18 % als Dijodhydroxyphenylpyruvat im Urin ausgeschieden wird.
1948 beschrieben HEPPEL und PORTERFIELD erstmals eine enzymatische Deshalogenierung von chlorierten und bromierten Derivaten des Methans in Schnitten und Extrakten aus Rattenleber.
Aus diesen, und hauptsächlich aus eigenen Untersuchungen an verschiedenen Geweben, schloß HARTMANN 1950 auf Grund des hohen Anteils an Dijodhydroxyphenylpyruvat als Kataboliten auf eine Desaminase. Dieses Abbauprodukt sollte spontan zu 2 Mol Jodid und ein Mol Hydroxyphenylpyruvat dejodieren (Siehe Abbildung 2).
Die Annahme der spontanen Dejodierung konnte aber von TONG et al. 1954 nicht bestätigt werden.
Im Jahre 1952 forderten ROCHE und Mitarbeiter erstmalig auf Grund ihrer eigenen Versuche eine spezifische Dejodase, die in der Lage ist, von 1-DJT ein Jodid-Ion abzuspalten, so daß 1-MJT entsteht. Durch einen zweiten Dejodierungsgang mit der gleichen Dejodase wird 1-MJT zu Jodid und 1-Tyrosin gespalten (siehe Abbildung 3).
HARTMANN konnte durch weitere Untersuchungen darstellen (1955, 1956, 1957, 1959), daß der Weg über eine Desaminase von der Zelle beschritten werden kann.

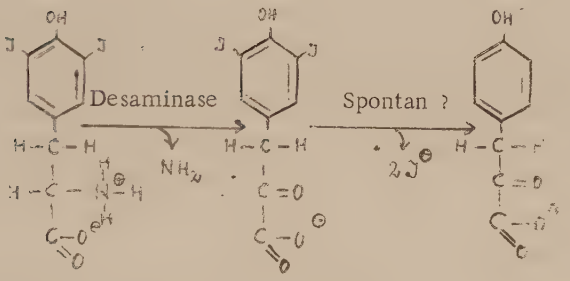
IV. Die bekannten Jodtyrosindejodasen

a) die von HARTMANN beschriebene Zellplasmadejodase

1) Organlokalisation

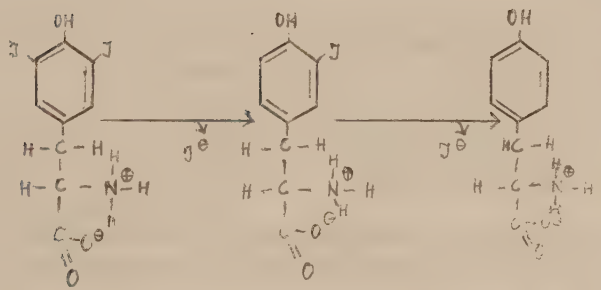
Die Untersuchung verschiedener Gewebe auf diesen Dejodasentyp beschrieb HARTMANN 1950 folgendermaßen: bei pH 8,0, 37 °C wurde Gewebe verschiedener Herkunft inkubiert und danach das freigewordene Jodid durch potentiometrische Titration gemessen. Leber, Niere und Schilddrüse zeigten eine hohe Aktivität, Magen- und Darmschleimhaut, Muskel und Hirngewebe eine wesentlich geringere, Pankreas und Milz keine dejodierende

Abbildung 2: Umsetzung von 1-DJT durch eine Desaminase. (nach HARTMANN 1950).



1-Dijodtyrosin — 3;5-Dijod-4-hyroxy-phenylpyruvat — p-Hydroxy-phenylpyruvat

Abbildung 3: Umsetzung von 1-DJT durch eine Dejodase. (nach ROCHE und Mitarbeiter 1952).



1-Dijodtyrosin — 1-Monojodtyrosin — 1-Tyrosin

Aktivität. Dijodhydroxyphenylpyruvat, neben Jodid das Stoffwechselprodukt der Zellplasmadejodase, erscheint in Nierenschnitten schneller als in Leberschnitten. Die Zellplasmadejodase wurde 1965 von SCHÄFER und Mitarbeiter im Muskel nachgewiesen. TONG et al. konnten zeigen, daß sich in der Schilddrüse kein Enzym dieses Typs befindet.

2) Lokalisation in der Zelle

HARTMANN homogenisierte 1956 Schweinelebergewebe, zentrifugierte die einzelnen Zellorganellen ab und untersuchte sie auf dejodierende Aktivität. Der Hauptteil der Aktivität befand sich im Zellplasma und im mitochondrienfreien Überstand. Weder Mikrosomen noch Mitochondrien zeigten irgendeine Enzymaktivität. Aus diesen Untersuchungen, denen keinerlei Energieträger oder sonstige Zusätze beigegeben wurden, postulierte HARTMANN das Zellplasma als Sitz dieser Dejodase.

3) Eigenschaften der Zellplasmadejodase

Durch fraktioniertes Aussalzen mit Ammoniumsulfat läßt sich aus Schweineleberhomogenaten in m/15 Phosphatpuffer eine Anreicherung der Dejodase auf mehr als das Hundertfache erreichen. Das Ferment fällt zwischen 25% und 40 % Ammoniumsulfatsättigung aus und ist ziemlich stabil. Durch Zusatz von Pyruvat (50 mg/g Gewebe) läßt sich die Aktivität des Fermentes auf das Zehnfache steigern (HARTMANN 1957). Die optimale Substratmenge beträgt 0,75 mg 1-DJT pro Gramm Gewebe; 37°C, pH 7,5 bis 7,9 und eine Inkubationsdauer von sechs Stunden sind optimal. Ein Homogenisieren und ein Andauen des Gewebes senkt die Enzymaktivität stark (HARTMANN 1955).
Als Ergebnis seiner Untersuchungen gibt HARTMANN 1959 folgende kinetische Daten an: auf ein Mol Dejodase (zu 100.000 g angenommen) und eine Minute umgerechnet ergeben sich folgende Werte:

Michaeliskonstante	$Km = 2,3 \times 10^{-1}$ Mol/l.
Grenzgeschwindigkeit	$Vmax = 6,5 \cdot 10^{-7}$ Mol Jodid/Min.
Aktivierungsenergie	$E = 1,8 \cdot 10^{4}$ cal/Mol.

SCHÄFER und Mitarbeiter untersuchten an frettierten Kaninchen die Wirkung verschiedener Metaboliten auf die Zellplasmadejodase. Dieses Enzym zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den Veränderungen des Serumkreatinin- und Serumkreatinspiegels sowie in schwächerem Ausmaß von dem 1-DJT-Serumspiegel in dem Sinne, daß mit dem Anstieg dieser Metaboliten auch ein Anstieg der Zellplasmadejodasenaktivität beobachtet werden kann. Ein Anstieg des Schilddrüsenhormonspiegels zeigt die gleiche Wirkung.

b) Die zuerst von ROCHE und Mitarbeiter beschriebene Mikrosomen-dejodase

1) Organlokalisation

ROCHE et al. beobachteten 1952 stark dejodierende Aktivität in Schilddrüsen-, Leber- und Nierengewebe, schwache in Darmschleimhaut und - je nach Art - schwache oder keine Dejodierung von 1-DJT im Herzmuskel. In Milz- und Lungengewebe konnte keine Aktivität festgestellt werden. Die Autoren sprachen der Schilddrüse den Hauptteil an der Dejodierung zu. TONG et al. stellten 1954 dar, daß die Schilddrüse nur dejodiert, daß Leber und Niere sowohl dejodieren als auch desaminieren können, daß aber Letzteres nur eine untergeordnete Rolle spielt. Weiterhin wurden Milz- und Hirngewebe, Herz- und Zwerchfellmuskulatur ohne positive Ergebnisse untersucht.
Die Behauptung, daß die Schilddrüse der Hauptsitz der Dejodierung sei, wurde von TONG et al. in Frage gestellt, denn auch bei thyreoektomierten Ratten erfolgt eine normale Dejodierung, ohne daß vermehrt Dijodhydroxyphenylbrenztraubensäure entsteht. Die Autoren vermuten daher, daß Leber und Niere allein als massive Organe die Hauptwirkung besitzen STANBURY (1956 a) beobachtete bei einem Diabetiker eine erhöhte 1-DJT-Ausscheidung nach intravenöser Gabe von 1-DJT und spricht der Niere den Hauptanteil an der Dejodierung zu. CAMERON (1960) vermutet auf Grund eigener Versuche den Darm als wichtige Stätte der Dejodierung.

2) Lokalisation in der Zelle

STANBURY und MORRIS untersuchten 1958 einzelne Zellorganellen, durch Homogenisieren und Zentrifugieren von Hammelschilddrüsengewebe, auf ihre dejodierende Aktivität. Hierbei weist die mikrosomale Fraktion, nach Zugabe der NADP enthaltenden löslichen Fraktion, die bei weitem stärkste Dejodierung auf. Wird die mikrosomale Fraktion vor Zugabe zur löslichen Fraktion auf 50^{o} C zwei Minuten lang erwärmt, so geht die dejodierende Aktivität verloren.
Ein entsprechendes Erwärmen der löslichen Fraktion hat keine Wirkung auf die Dejodierungsaktivität. Daraus schließen die Autoren, die Dejodase sei ein mikrosomales, zellständiges Enzym, das NADP als Cofaktor benötigt. Diese Beobachtung wurde durch CHOUFOER et al. bestätigt.

3) Lokalisation in Zellfreien Systemen

STANBURY und Mitarbeiter untersuchten 1956 (a) normalen Urin und

normales Serum auf eine Mikrosomendejodase und konnten keine Enzymaktivität feststellen.

4) Die biochemische Leistung der Mikrosomendejodase

Diese Tyrosindejodase ist nicht in der Lage, jodierte Proteine, Thyroxin oder Trijodthyronin zu deshalogenieren (ROCHE und Mitarbeiter 1953, Leading Articles in The Lancet 1956). Diese Dejodase metabolisiert 1-MJT besser als dl-MJT (STANBURY et al. 1956). Eine parenterale Gabe von 1-MJT wird zu 99 % als Jodid mit dem Harn ausgeschieden, während dl-DJT zu 50 % als d-MJT und zu 50 % als Jodid im Harn erscheint. Dagegen werden 1-DJT und dl-DJT ohne Unterschied metabolisiert, eine auffallende Feststellung, denn im allgemeinen werden 1-Aminosäuren schneller von Enzymen umgesetzt als d-Aminosäuren (STANBURY et al. 1957, HARTMANN 1950).
Das 1-MJT wird schneller abgebaut als 1-DJT, wahrscheinlich, weil das erste Jodatom fester an dem Phenylrest haftet (STANBURY und MORRIS 1958). Für die Mikrosomendejodase ermittelten die soeben genannten Autoren 1958 folgende kinetische Daten, ein Enzymmolekulargewicht von 100.000 angenommen:

Für das 1-DJT ist die

Michaeliskonstante	$Km = 3,7 \cdot 10^{-2}$ Mol/l
Grenzgeschwindigkeit	$Vmax = 4,5 \cdot 10^{-7}$ Mol Jodid/Min.

Für das 1-MJT ist die

Michaeliskonstante	$Km = 9,2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l
Grenzgeschwindigkeit	$Vmax = 5,5 \cdot 10^{-7}$ Mol Jodid/Min.

Die Dejodierungsgeschwindigkeit steigt mit der 1-DJT-Konzentration, 1-MJT-Zugabe reduziert diese Geschwindigkeit, wohl durch Substratkompetition. Bei der 1-DJT-Metabolisierung fällt kaum 1-MJT an, da dieses auf Grund der höheren Grenzgeschwindigkeit schneller abgebaut wird als es entsteht.

5) Die optimalen Versuchsbedingungen für die Mikrosomendejodase

ROCHE und Mitarbeiter geben, nach Isolierung der Dejodase 1953, als optimales pH 6,8 an, bei einer optimalen Substratmenge von 4 bis 8 µg 1-DJT/ml Homogenat, d.h., ca. 300 mg Gewebe. STANBURY und Mitarbeiter untersuchten 1958 150 mg Hammelschilddrüsengewebe mit 13,9 mµMol und 48,6 mµMol 1-DJT bei einem pH von 7,3 und 37°C, unter Zugabe von 25 µMol NADP als Cofaktor. KUSAKABE und MIYAKE

untersuchten 1963 1 bis 3,5 mg humanes Schilddrüsengewebe mit 0,004 - 0,009 µg 1-DJT, bei einem pH von 7,4 und 37° C (Inkubationsdauer 4 h).

6) Inhibition und Aktivierung der Mikrosomendejodase

ROCHE und Mitarbeiter berichteten 1953, daß die Dejodase in tiefgefrorenem Schilddrüsengewebe wochenlang haltbar ist. Bei 2°C schwindet ihre Aktivität schnell, die Halbwertzeit beträgt 24 h, und nach 8 Tagen läßt sich keinerlei Aktivität mehr feststellen. In dieser Veröffentlichung wird weiterhin berichtet, daß sich die Aktivität der Dejodase in der Schilddrüse durch thyreotropes Hormon steigern läßt. Eine Inhibition wird durch das Thyreostaticum 6-N-Propylthiouracil nicht erreicht, wohl aber durch Monojodessigsäure. Daraus vermuten ROCHE und Mitarbeiter, daß es sich hier um eine Dehydrogenase mit -SH als Wirkgruppe handeln müsse.
TONG und Mitarbeiter berichten 1954, daß eine Homogenisierung des dejodasehaltigen Gewebes eine stark inhibierende Wirkung hat. Durch diesen Vorgang wird die Mikrosomendejodase stärker getroffen als die Zellplasmadejodase. STANBURY inhibiert 1957 die Dejodase durch zwei Minuten Erwärmen auf 50° C. Weiterhin läßt sich das Enzym durch p-Chlormercuribenzoat inhibieren, durch Acetonpräzipitation und durch Ultraschall inaktivieren. 0,001 Mol Zyanid vermag nicht die Wirkung des Enzyms zu hemmen. α-Ketoglutarat und Pyruvat steigern zwar den Jodtyrosin-Katabolismus, aber nur durch Aktivieren der Desaminase (siehe auch TONG et al. 1954). Nicotinamid trägt zur Aktivitätserhaltung der Dejodase bei, und Versene (MERK) ein Penicillinamin, hat einen stark schützenden Effekt bei einer Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-4}$ Mol (STANBURY 1958). Als Cofaktor der Mikrosomendejodase zeigt NADP einen stark aktivierenden Effekt (BASTOMSKY 1966), im Gegensatz zu Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Flavin-adenin-dinucleotid, Flavin-adenin-mononucleotid und Adenosin-triphosphat, die keine diesbezügliche Wirkung besitzen. MAAYAN und ROSENBERG konnten 1963 zeigen, daß Thyreotropin eine Erhöhung der NADP-Konzentration in der Schilddrüsenzelle bewirkt, durch welche die Dejodase aktiviert wird. Hiermit läßt sich erklären, warum Thyreotropin keinerlei positive Wirkung auf die Aktivität der Dejodase in der Leber besitzt. Auch die hemmende Wirkung des Thyroxins auf die Schilddrüsendejodase sei vermerkt (Leading Articles in The Lancet 1956)

V. Die bekannten Thyroxindejodasen

Es sollen noch folgende zwei Thyroxindejodasen erwähnt werden, da sie zum Teil in der Lage sind, Jodtyrosine zu metabolisieren.

a) Die von TATA beschriebene Thyroxindeshalogenase

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Jodtyrosindejodasen handelt es sich bei der von TATA 1960 beschriebenen Dejodase um eine Thyroxindeshalogenase. Dieses Enzym wurde im somatischen Kaninchenmuskel untersucht und ist demnach in der Lage, sowohl Thyroxin, Trijodthyronin als auch bromierte Thyronine zu deshalogenieren. Dieser Deshalogenasetyp konnte nicht in der Schilddrüse, aber mit reichlicher Aktivität in Leber, Niere, Muskel und Hirn nachgewiesen werden; auch bei Kaltblütlern wie Frosch und Forelle. Das Enzym ist wasserlöslich und verliert in 12 Tagen 50 % seiner Aktivität. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,4 und 7,3. Als Coenzym werden 10 µMol Flavin-mononucleotid und 6 µMol Ferro-Ionen pro ml Homogenat (10-15 mg Protein) benötigt. Auch Stickstoff katalysiert die Deshalogenisation, aber weder O_2, H_2O_2, Katalase noch Pyruvat zeigen diese Wirkung. Inhibieren läßt sich dieses Enzym mit 1 mMol Atebrin oder 0,5 mMol 8-Hydroxyquinolin. Vom Autor wurden folgende Michaeliskonstanten ermittelt:

Km Thyroxin	$1,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l
Km Trijodthyronin	$7,4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l
Km Tetrabromthyronin	$9,2 \cdot 10^{-6}$ Mol/l
Km 1-DJT	$30 \cdot 10^{-6}$ Mol/l
Km 1-MJT	$50 \cdot 10^{-6}$ Mol/l.

Diese Tabelle wurde hier aufgeführt, um zu verdeutlichen, daß diese Thyroxindeshalogenase in der Lage ist, wenn auch in geringem Maße, Jodtyrosine zu dejodieren.

b) Die von KURLAND und Mitarbeiter beschriebene Thyroxindejodase

Den Autoren fiel 1960 auf, daß die Leukozyten thyreotoxischer Patienten stärker Thyroxin dejodieren als die euthyreoter Probanden, und daß die Aktivität der Leukozyten myxödematöser Patienten noch geringer ist als die der Euthyreoten.
Die Untersuchung ergab eine thermolabile Dejodase, die durch 30 Minuten Erwärmen auf 60 - 70 °C inaktiviert wird, und die ATP und NADH als Cofaktoren benötigt. Das Enzym ist aerob, denn eine Stickstoffatmosphäre

hebt die Wirkung des Enzyms auf. Inhibieren läßt sich diese Thyroxin-dejodase durch 10^{-3} Mol Sublimat.

B. ANGABEN ZUR VERSUCHSANORDNUNG

Die Versuchsanordnung ist möglichst einfach gehalten worden, um eine gute Übersicht zu erhalten und um auftretende Fehlerquellen schnell aufdecken zu können. Die Versuchsanordnung ist folgendermaßen gegliedert:

a) Inkubation von Blutplasma als Träger der gesuchten Dejodase mit dem beigefügten Substrat, dem 1-Dijodtyrosin. Weiterhin werden vor Inkubationsbeginn Coenzyme und Energieträger zugesetzt, um optimale Voraussetzungen für den Reaktionsablauf zu gewährleisten.

b) Trennung der Reaktionspartner 1-Dijodtyrosin und Jodid durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 Fine. Das Eluat wird in 1 ml Fraktionen durch einen automatischen Fraktionssammler aufgefangen.

c) Da als Substrat radioaktiv markiertes 1-Dijodid-125-tyrosin verwendet wird, wird die Radioaktivität der einzelnen 1 ml Fraktionen durch einen Scintillationszähler gemessen.

Da das Verhältnis von Jodid zu 1-DJT mit dem Alter der Substratlösung variiert, muß vor Beginn der einzelnen Doppelversuche ein Leerwert ermittelt werden, der auch als Doppelwert durchgeführt wird. Dieser Leerwert wird genau wie der Versuchswert durchgeführt, d.h., die Substratlösung wird ohne Plasmazusatz inkubiert, fraktioniert und im Scintillationszähler die Radioaktivität der einzelnen 1 ml Fraktionen gemessen.

Das Ergebnis dieses Leerwertes stellt also das aktuelle Verhältnis von Jodid zu 1-DJT dar. Falls eine Dejodase im Blutplasma vorhanden ist, und die Bedingungen (Cofaktor-, Energieträger-, Substratkonzentration etc.) für diese Dejodase günstig sind, so muß bei dem Versuchsergebnis das Jodid/1-DJT im Vergleich zum soeben ermittelten Leerwert zugunsten des Jodids verschoben sein.

I. Das verwendete Sephadex und der Vorgang bei der Fraktionierung

a) Herkunft und Eigenschaften des Sephadex

Für die hier durchgeführte Gelfiltration wird Sephadex G 25 Fine (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt/Main, Inkusstr. 11) verwendet. Die Wasseraufnahme beträgt pro Gramm Sephadex G 25 Fine $2,5 \pm 0,2$ ml. Sephadex

ist ein dreidimensionales Netz von Polysacchariden. Es sind keine freien Ionengruppen vorhanden, sondern zahlreiche -OH-Gruppen, so daß neben der starken Quellung eine sehr geringe Polarität vorliegt. Große Moleküle wie in unserem Falle Eiweiß wandern schnell im interstitiellen Raum zwischen den Sephadexgranula durch. Je kleiner die Moleküle, um so mehr dringen sie in die Gelphase ein und um so mehr werden sie gebremst. In unserem Falle dringt das kleinere Jodid in die Gelphase ein und wird später im Eluat erscheinen. Basische Aminosäuren (hier das 1-DJT) werden von den -OH-Gruppen reversibel gebunden und treten sehr spät im Eluat auf.

b) Präparation der Säule

Zwei Gramm Sephadex G 25 Fine läßt man in 15 bis 20 ml Phosphatpuffer (pH 6,0) 1 - 2 Stunden quellen. Durch die sofortige Verwendung von Puffer ist eine spätere pH-Einstellung überflüssig. Das gequollene Sephadex wird anschließend blasenfrei in die Chromatographiesäule (28 ml Inhalt, 1 cm Durchmesser, Glasfritte als Säulengrund) gegossen. Nach Absetzen des Gels auf den Säulengrund ergibt sich eine Gelsäule von ca. 8,5 cm Höhe, mit einem interstitiellen Flüssigkeitsraum von ca. 4 cm Höhe. Vor Versuchsbeginn läßt man eine Stunde lang Puffer durchlaufen.

c) Das Fraktionieren

Nach Abpipettieren des überstehenden Puffers wird die zu untersuchende Flüssigkeit sehr vorsichtig, mittels einer Pipette auf die Gelsäule gegeben. Es dürfen hierbei keine Gelpartikel aufgewirbelt werden. Ist die zu untersuchende Flüssigkeit in das Gelbett eingedrungen, wird vorsichtig (auch hier keine Gelpartikel aufwirbeln !) Puffer bis zu einem Überstand von ca. 1 cm nachgefüllt. Jetzt kann das den Phosphatpuffer enthaltende Vorratsgefäß auf die Chromatographiesäule aufgesetzt werden und die Sammlung von 1 ml Fraktionen begonnen werden.

Diese 1 ml Fraktionen werden mittels des Fraktionssammlers (Typ F^T 63 der Firma Bender und Hobein GmbH, München-Karlsruhe) gesammelt.

Abbildung 4 (auf Seite 24): Graphische Darstellung der erhaltenen Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen. In den Hauptversuchen wurde immer dieser Typ der Radioaktivitätsverteilung erhalten. Sammlung der ersten 18 ml in 1 ml Portionen, damit eine genaue Erfassung der Blutplasma-, Jodid-, 1-DJT-Radioaktivität gewährleistet ist. Nach dem 18. ml ist nur noch 1-DJT zu erwarten, so daß eine 20 ml Portion gesammelt wird. Der 39. ml dient als Kontrolle: er darf keine Radioaktivität mehr enthalten.

Abbildung 4 (Erklärung siehe S. 23)

d) Regeneration der Säule

Durch langes (6 h und mehr) Durchspülen mit Pufferlösung läßt sich eine eventuell noch vorhandene Radioaktivität herausspülen. Es konnte bei den in den Versuchen verwendeten Substratmengen in der Spülflüssigkeit nie Radioaktivität entdeckt werden. Messungen des Sephadex sofort nach dem Fraktionieren auf eine noch vorhandene Aktivität ergaben keine positiven Resultate. Nach Durchlaufenlassen von hohen Jodid-131-Aktivitäten ergaben Messungen von Sephadex im Scintillationszähler keine Verseuchung. Das Sephadex wurde jedoch in den Hauptversuchen nie mehr als dreimal verwendet, da die Trennschärfe mit der Zahl der Fraktionierung nachließ.

e) Die verwendeten Glasröhrchen

Die im Fraktionssammler verwendeten Glasröhrchen wurden von der Firma Bender und Hobein bezogen und sind genau auf 1 cm Durchmesser kalibriert. Um sicher zu sein, daß keine Radioaktivität in den Glasröhrchen verbleibt, wurden die Röhrchen sofort nach der Messung ihres Inhaltes im Scintillationszähler gründlich mit Seife und Wasser mittels einer Bürste gereinigt. Im Verlauf der Versuche wurden alle Glasröhrchen viermal auf ihren Leerwert im Scintillationszähler überprüft. Alle Röhrchen, die mehr als 100 IPM über den Nulleffekt hatten, wurden nochmals gereinigt. Eine nachträgliche Reinigung ist nur dreimal notwendig gewesen; im Durchschnitt wurden zwischen 60 und 80 IPM als Glasleerwert registriert. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde der Mittelwert von 73 IPM als Glasröhrchenleerwert verwendet.

II. Das optimale pH zur Gelfiltration

Um möglichst wenig das pH ändern zu müssen, wurde zuerst versucht, Jodid von 1-DJT bei dem physiologischen Blut-pH von 7,4 mittels Sephadex G 25 Fine zu trennen. Es hat sich herausgestellt, daß bei diesem pH das Sephadex das Jodid nicht von 1-DJT zu trennen vermag, daß aber mit steigendem oder sinkendem pH diese Trennung deutlich zunimmt (Siehe Abbildung 5, a, b, c, d). Als optimal für die folgenden Versuche hat sich pH 6,0 erwiesen, da hier die Nähe an pH 7,4 und die Trennschärfe sehr günstig sind. In den folgenden Abbildungen soll die Abhängigkeit der Trennqualität vom pH demonstriert werden.

Abbildung 5 a: Trennschärfe bei pH 2,9

Abbildung 5 b: Trennschärfe bei pH 6,0

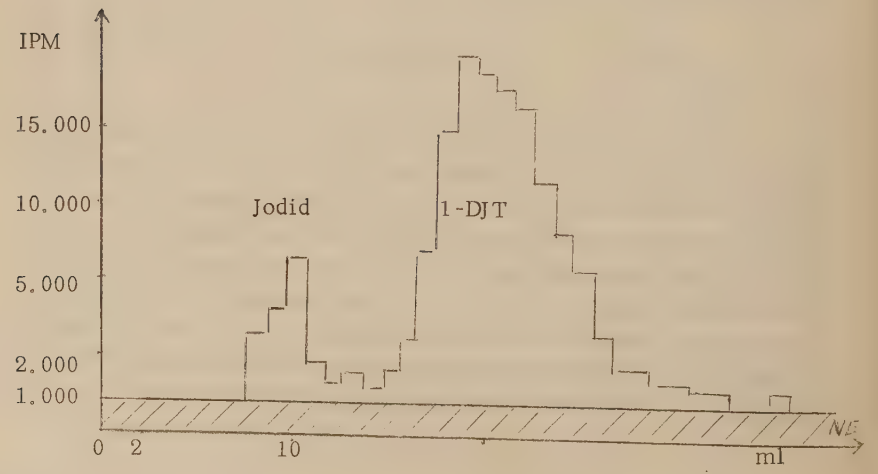


Abbildung 5 c: Trennschärfe bei pH 7,4

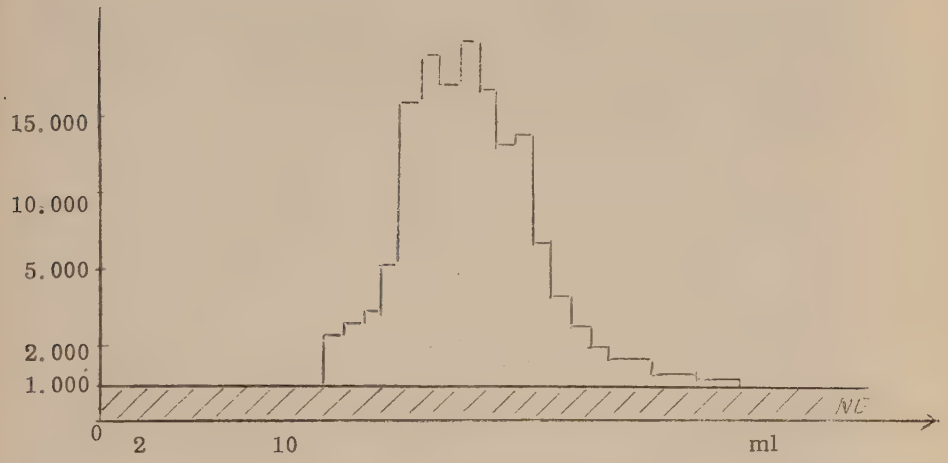
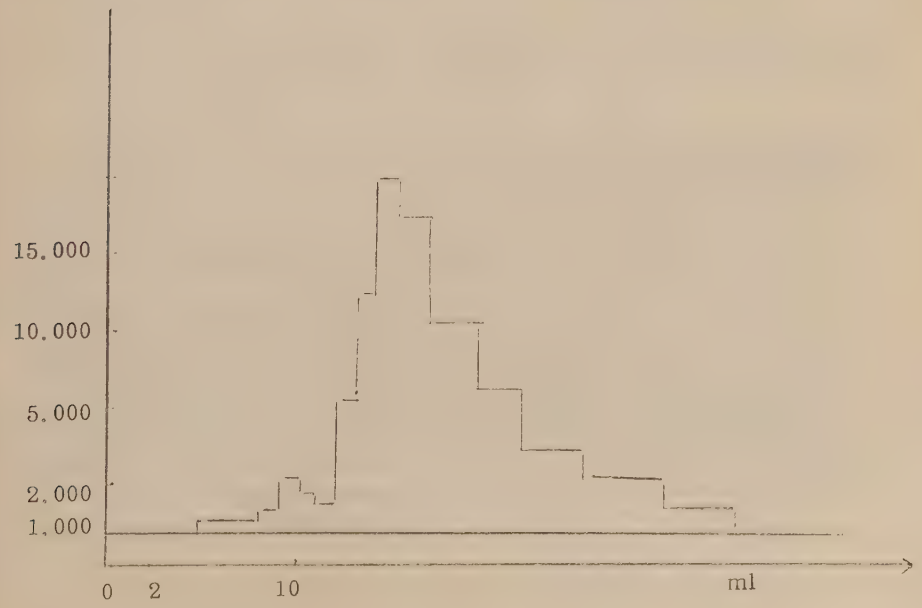


Abbildung 5 c: Trennschärfe des Sephadex G 25 Fine bei pH 8,0



III. Herstellung der Pufferlösung

Zur Herstellung des Phosphatpuffers mit einem pH von 6,0 werden zwei Lösungen A und B hergestellt, die im Verhältnis Lösung A : Lösung B = 88:12 gemischt werden. Die Lösung A enthält 9,078 g KH_2PO_4 · 2 H_2O/l, die Lösung B 11,876 g Na_2HPO_4 · 2 H_2O/l (D´ANS).

IV. Das Gerät zur Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Institut für Physikalische Therapie und Röntgenologie (Riederinstitut) gemessen. Das Strahlungsmeßgerät, ein Kristallbohrlochscintillationszähler, besteht a) aus einer Kristallbohrlochsonde der Firma Friesecke und Höpfner GmbH, Erlangen-Bruck, Typ FH 488/Z 20 SP. b) aus einem Scintillationszähler der gleichen Firma, Typ FH 90/902. Der Nulleffekt NE der Apparatur beträgt 880 IPM. Die Jod^{131}-Empfindlichkeit beträgt 971 IPM pro 1/1000 Mikrocurie in 4 ml Lösung. Vor der Messung muß also allen 1 ml Fraktionen drei ml Wasser zugesetzt werden.

V. Die pro Versuch verwendete Radioaktivität

Die pro Versuch zugesetzte 1-Dijod-125-tyrosinradioaktivität wurde von zwei Gesichtspunkten bestimmt:

vom sparsamen Umgang mit dem radioaktiven Material und von der für das Strahlungsmeßgerät optimalen Impulszahl/Minute.

Diese beträgt bei der oben angegebenen Apparatur 5.000 bis 80.000 IPM. Pro Versuch, bestehend aus zwei Leerwertsbestimmungen und zwei Enzymwertbestimmungen, wurden ca. 0,5 µCi 1-DJT verwendet, die etwa 500.000 IPM entsprechen; diese Impulszahl ergibt ca. 1.000 bis 15.000 IPM pro 1 ml Fraktion.

VI. Serum- und Plasmaherkunft

Das Serum, das in den folgenden Versuchen untersucht wird, stammt von Kindern aus der hiesigen Klinik, wobei immer darauf geachtet wurde, daß die Diagnose der behandelten Kinder keine Beziehung zum Jodhaushalt aufweist. Es wurde nur frisches, soeben aus der Vene punktiertes Blut verwendet; das Serum wurde nach üblicher Labortechnik (Zentrifugieren bei 3.000 U/Min. 10 Minuten lang) gewonnen. Als Plasmaspender erklärten sich Mitglieder der Ärzteschaft bereit, das nötige Blut zu spenden. Vier ccm Venenblut wurden sofort 1 ccm einer 5,6 %igen Natriumcitricum-Lösung zugesetzt. Das Citratplasma wurde wie das Serum durch Zentrifugieren gewonnen.

VII. Die Inkubation

Die Inkubation wurde bei 37°C und einem pH von 7,4 durchgeführt. Die Inkubationszeit, die zwischen 100 und 300 Min. variiert, wird bei den einzelnen Versuchen angegeben.

VIII. Das verwendete 1-Dijodtyrosin

a) Die radioaktive 1-DJT-Lösung

Das mit Jod 125 (Halbwertzeit 60 Tage) markierte 1-3;5-Dijodtyrosin wurde von "The Radiochemical Centre", Amersham in England, bezogen. Dieses 1-DJ^{+}T liegt in einer 50 %igen wässerigen Propylenglykollösung vor. Das Volumen der Lösung beträgt 1 ccm, darin sind 0,09 mg 1-DJT mit einer Aktivität von 200 Mikrocurie enthalten. Es entfallen also bei Versuchsbeginn 2,22 µCi auf 1 µg 1-DJ^{+}T.
Diese so erhaltene Lösung wurde folgendermaßen aufbereitet.
0,2 ml der 1-DJ^{+}T-Lösung wurden mit 0,8 ml Phosphatpufferlösung (pH 6,0) verdünnt und in der oben angegebenen Weise auf der Sephadexsäule fraktioniert. Nach Messung der Radioaktivität in den einzelnen Portionen ergaben sich, eine Woche nach Erhalten der 1-DJ^{+}T-Lösung, drei Aktivitätsmaxima (siehe Abbildung 6).

1. von 10 - 12 ml: 116.392 IPM $\hat{=}$ 5,55 % der Gesamtaktivität. Da in den für Jodid typischen Fraktionen (Siehe später) mit diesem identisch.
2. von 14 bis 17 ml : 124.422 IPM $\hat{=}$ 5,95 %. Unbekannter Inhalt (vermutlich 1-Monojodtyrosin).
3. von 19 bis 28 ml: 1.858.457 IPM $\hat{=}$ 88,6 %. Dies ist die 1-DJT-Fraktion, da die Lage auf 1-DJT hinweist und diese Fraktion sich durch Schilddrüsengewebe metabolisieren läßt (siehe später).

Die 20. bis 26. ml Fraktionen wurden für weitere Versuche verwendet. Auf diese Weise wurde im Verlauf der Untersuchungen die Stammlösung mehrmals fraktioniert, so daß für die einzelnen Versuche eine möglichst hochprozentige und reine 1-$DJ^{+}T$-Lösung zur Verfügung stand. Da sich das so gewonnene 1-$DJ^{+}T$ in 6 ml pH 6,0 Puffereluat (in diesem Falle wurde den einzelnen 1 ml Fraktionen vor der Messung kein Wasser zur Auffüllung auf 4 ccm zugesetzt) befindet, muß dieses Puffereluat durch Zugabe von 0,1 N NaOH auf 7,4 gebracht werden. Die genaue Einstellung auf dieses pH wurde mit Hilfe eines pH-Meters kontrolliert. Die 1-$DJ^{+}T$-Konzentration dieser Lösung läßt sich mit Hilfe ihrer Radioaktivität und einer hierfür angefertigten Jod 125 Zerfallskurve.

b) Die nicht radioaktive 1-DJT-Lösung

Um die Substratmenge pro Versuch beliebig steigern zu können, ohne über die optimale Impulszahl/Min. hinausgehen zu müssen, wurde eine 1-DJT-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 g/l Puffer hergestellt, die dem jeweiligen Versuch zugesetzt wurde. Diese 1-DJT-Lösung, auf pH 7,4 eingestellt, wurde alle drei Wochen frisch hergestellt und bei -15°C aufbewahrt. Hersteller des 1-Dijodtyrosins: Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzbach.

IX. Die pro Versuch verwendete 1-DJT-Menge

Durch Zugabe der nicht radioaktiven 1-DJT-Lösung läßt sich die Substratkonzentration beliebig steigern bei gleichbleibender IPM-Zahl/Versuch. Es wurde als oberste Konzentration 200 µg 1-DJT/ml Plasma gewählt.

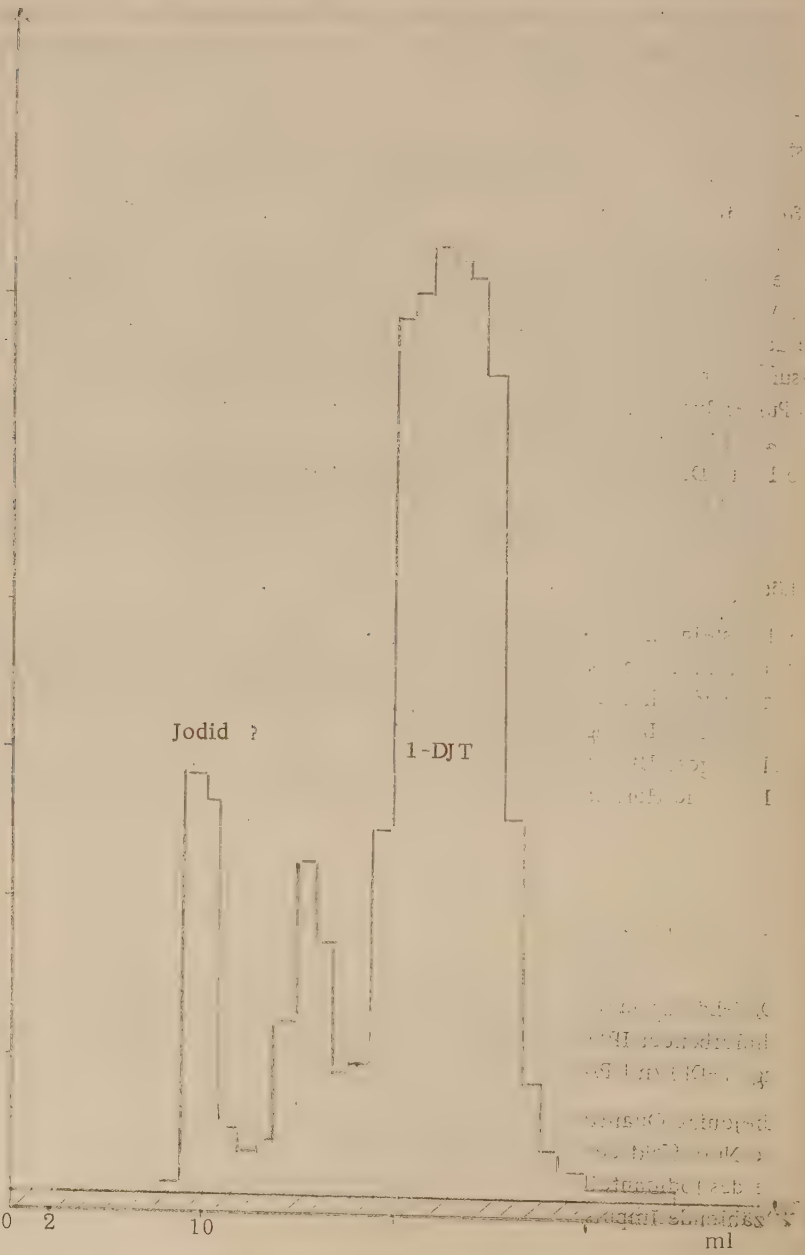
Die minimale Substratkonzentration ist diejenige Quantität 1-DJT, die mindestens 100.000 IPM abgibt. Der hohe Nulleffekt der Meßapparatur (880 IPM) zwingt dazu, da eine Zunahme des Jodidanteils um 1 % bei 100.000 IPM eine der Jodidfraktion zuzuzählende Impulszahl von 1.000 IPM

ergibt; diese ist auf 3 bis 5 1 ml Portionen verteilt, womit 200 - 250 IPM auf ein Röhrchen entfallen, eine IPM die etwa 1/4 des Null-Effekts beträgt. Eine weitere Senkung der minimalen Substratkonzentration ist daher nicht zu empfehlen, da hierbei den Fehlerquellen ein nicht zu kontrollierender Spielraum gegeben wird.

X. Die pro Versuch benötigte Arbeitszeit

Das soeben punktierte Venenblut wird 10 Minuten lang zentrifugiert. Dem so gewonnenen Plasma bzw. Serum werden die gewünschten Zutaten beigegeben. Es vergehen also vom Augenblick der Venenpunktion bis zum Inkubationsbeginn höchstens 20 Minuten. Auf Grund der geringen Halbwertzeit der in der Literatur beschriebenen Dejodasen soll diese Zeit möglichst nicht überschritten werden.
Die Inkubationszeit wurde zwischen einer Stunde und vier Stunden variiert. In dieser Zeit lassen sich die benötigten Sephadexsäulen herrichten.
Das Fraktionieren benötigt eine gute Stunde, und das Messen der Radioaktivität der 20 Glasröhrchen im Scintillationszähler dauert 35 Minuten bei einer Meßzeit von 1 Min. pro Fraktion.
Die Arbeitszeit beträgt also 2 Stunden + die Inkubationszeit. Bei einer gemeinsamen z.B. 2stündigen Inkubation aller Untersuchungsmaterialien und einer geschickten Ausnützung der Zeit kann an einem 10-Stunden-Tag 4 mal fraktioniert werden, das sind 1 Doppelleerwert und ein Doppelwert für die Plasmauntersuchung.

Abbildung 6: Fraktionierung der vom Radiochemical Centre Amersham erhaltenen radioaktiven 1-DJ^{+}T- Lösung.



I. Die Stabilität der 1-DJ ^{125}T-Lösung

Die 1-DJ ^{125}T-Stammlösung wurde bei -15°C aufbewahrt. Eine dreimalige Fraktionierung in einem Zeitraum von 97 Tagen ergibt einen langsamen Anstieg des Jodidanteils von 5,4 % auf 6,8 %. Die Behauptung von ROCHE und Mitarbeiter 1952, wonach 1-DJT in der Tiefkühltruhe nicht zerfallen würde, kann hier nicht in vollem Umfang bestätigt werden.
Die für die laufenden Versuche verwendete 1-DJT-Lösung wurde bei 4°C (pH 7,4) aufbewahrt, und zerfällt hier spontan von (angenommenen) 0 % Jodid am Tage der Stammlösungsfraktionierung bis auf 11 % Jodidanteil am 16. Tage.
HARTMANN beschrieb 1955 eine ähnliche Spontanjodierung von 1-DJT unter den gleichen Bedingungen.
Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, vor jeder Versuchsreihe den Leerwert ermitteln zu müssen. Um möglichst Fehlerquellen zu entgehen, wird der Leeransatz allen Einflüssen ausgesetzt, denen die anderen Ansätze mit Serum bzw. Plasma auch unterworfen sind. Also wird der Leerwert mitinkubiert, ihm werden die gleichen Energieträger und sonstige Zusätze beigegeben. Auf diese Weise stellt der Leerwert einen Eichwert für den betreffenden Versuch dar.

II. Erkennung der Serum- bzw. Plasmafraktion (P.B.J.)

Die Eiweißfraktion läßt sich leicht an ihrer gelben Farbe erkennen. Sie sticht dadurch aus dem weißen Sephadex heraus. In den Fraktionsröhrchen fällt diese Fraktion durch ihre starke Opalescenz in den Röhrchen 3 bis 5 auf. Ein Erhitzen aller Röhrchen ergibt eine Eiweißfällung nur in den Röhrchen 3 bis 5. Daß die Eiweißfraktion als erste im Eluat erscheint, liegt an der Größe der Eiweißmoleküle. Diese vermögen nicht in die Gelphase einzudringen und werden schnell durch den interstitiellen Raum gespült.

III. Erkennung der Jodidfraktion

Zur Lokalisation der Jodidfraktion in dem in 1 ml Fraktionen gesammeltem Eluat wurde Na J ^{131} auf die Sephadexsäule gegeben und franktioniert. Die

Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde anschließend im Bohrloch-scintillationszähler gemessen. Auf diese Weise wurde ermittelt, daß das Jodid sich in den Fraktionen 8 bis 12 befindet.

IV. Erkennung der 1-DJT-Fraktion

Um sicher zu sein, daß das Aktivitätsmaximum zwischen der 15. und 28. ml Fraktion das 1-DJT darstellt, wurde eine photometrische Untersuchung in Anlehnung an die Dijodtyrosinbestimmung nach SCHLOSSBERGER durchgeführt.
1 ml einer frisch bereiteten 0,1 %igen 1-DJT-Lösung wird auf die Sephadexsäule gegeben, und das Eluat in der beschriebenen Weise gesammelt. Den einzelnen 1 ml Portionen werden 4 ml H_2O zugesetzt, durch konz. HCl auf pH 0,7 gebracht und mit 0,2 ml einer frisch bereiteten 1 %igen $NaNO_2$-Lösung 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden 0,05 ml 1 %ige Kobaltchlorid- und 5,0 ml einer Essigsäureacetatlösung (3 Vol. gesättigtes Natriumacetat und 2 Vol. 20 %ige Essigsäure) hinzugefügt und im Eppendorffphotometer die Extinction gegen den Reagenzleerwert durch ein Cadmiumfilter bei 405 mμ gemessen. Hierbei ergeben sich von der 15.1 ml Fraktion an steigende Extinctionswerte mit dem Maximum bei der 20. 1 ml Fraktion, um dann bis zur 28. 1 ml Fraktion wieder den Leerwert anzunehmen.

V. Die Jodidbindung an Serum- bzw. Plasmaproteine

HARTMANN (1956), SCRIBA und Mitarbeiter (1966) untersuchten die Serumbindungskapazität für Jodid. Die genannten Autoren konnten hierbei keine nennenswerte Bindung feststellen. In eigenen Versuchen wurde die Affinität des Jodids zu Serum- und Plasmaeiweiß bei niedrigen Jodidkonzentrationen untersucht. Eine Natrium-Jodid-131-Lösung wurde 90 Minuten mit je 1 ml Serum und Plasma inkubiert, und nach Trennung auf der Sephadexsäule die Radioaktivität der Proteinfraktion gemessen.
Das Jodid 131 wurde aus dem Riederinstitut erhalten, Hersteller ist die Firma Höchst AG, Frankfurt/Main. Es liegt als Natrium-Jodid-131 in einer Natriumthiosulfatlösung vor, mit einer Konzentration von 1 μg Jodid/ml. Am Versuchstag entsprachen 1 μg Jodid 131 10 Mikrocurie.

a) Abbildung 8: Ergebnisse der Serumuntersuchung:

	Gesamt Jodid		An Serum gebundenes Jodid		
	IPM x 8	µg J^-	IPM x 8	µg J^-	Anteil in %
1	919.131	0,76	6.104	0,006	0,65
2	992.451	0,81	5.410	0,0044	0,54

b) Abbildung 9: Ergebnisse der Plasmauntersuchung

	Gesamt Jodid		An Plasma gebundenes Jodid		
	IPM x 8	µg J^-	IPM x 8	µg J^-	Anteil in %
1	39.881	0,031	62	0,00005	0,155
2	42.469	0,034	64	0,00004	0,12
3	542.411	0,440	566	0,0004	0,105
4	602.730	0,50	387	0,0003	0,062

Wie aus den Abbildungen 8 und 9 ersichtlich ist, werden die Ergebnisse von HARTMANN und SCRIBA et al. bestätigt. Es kann weiterhin aus der Abbildung 9 abgelesen werden, daß bei 10fach höherer Jodidkonzentration das an Plasma gebundene Jodid ebenfalls um fast den gleichen Betrag steigt, so daß der Prozentsatz in der gleichen Größenordnung bleibt.

VI. Die 1-DJT-Bindung an Plasma- und Serumproteine

TONG und Mitarbeiter weisen 1954 darauf hin, daß 90 % des 1-DJT nach Inkubation mit Serum dialysierbar bleibt. In eigenen Versuchen wurde nach Ermittlung des Leerwertes Lw (= aktuelles Verhältnis von Jodid zu 1-DJT) 4 µg 1-DJT mit 0,5 ml Plasma 10 Minuten geschüttelt, 130 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend fraktioniert. Eine eventuelle Dejodase wurde durch 0,5 mg Monojodessigsäure inhibiert.

Abbildung 10:

	Gesamt IPM	Serum IPM u. %Anteil	Jodid IPM u. %Anteil	1-DJT IPM u. %Anteil
Lw. 1	622.048		14.700 ≙ 2,22%	648.206 ≙ 97,78%
Lw. 2	678.373		12.233 ≙ 1,94%	665.126 ≙ 98,06%
Pl. 1	660.048	21.876 ≙ 3,30%	12.211 ≙ 2,20%	625.017 ≙ 94,47%
Pl. 2	338.572	24.619 ≙ 3,63%	13.226 ≙ 2,05%	638.807 ≙ 94,32%

In allen vier Ansätzen bleibt der Jodidanteil bei 2%. Eine nennenswerte Eiweißjodidbindung ist, wie dargestellt, nicht zu erwarten. Somit darf angenommen werden, daß die Plasmaeiweißfraktion ihre Aktivität von dem 1-DJT erhält. Die Bindungskapazität der Plasmaproteine beträgt demnach 3,30 bis 3,63 %. In allen Versuchen, denen Serum bzw. Plasma zugesetzt wurde, ist der Anteil der Proteinfraktion an der Gesamtaktivität ermittelt worden. Das arithmetische Mittel aus 21 Werten beträgt für Serum: $\bar{x}$ = 6,10 % mit einer Streuung von 0,45 bis 19,6 %. Das arithmetische Mittel aus 25 Werten für Plasma beträgt: $\bar{x}$ = 5,30 % mit einer Streuung von 3,1 bis 7,20 % ! Diese Schwankungen der Eiweiß-1-DJT-Bindungskapazität hängt hierbei nicht von der Menge des zugesetzten 1-DJT ab; sie variieren mit dem Patienten, dem das Serum bzw. Plasma entnommen wurde.

VII. Dejodierung durch Schilddrüsengewebe

Um die Leistungsfähigkeit der Versuchsanordnung zu prüfen, wurde 1-DJT mit humanem und bovinem Schilddrüsengewebe inkubiert und anschließend auf die erfolgte Dejodierung untersucht. Als Cofaktor diente 3,0 µMol NADP. Die Inkubationsdauer betrug 130 Minuten.

Abbildung 11: Ergebnisse der Dejodierung von 1-DJT durch Schilddrüsengewebe

Gewebeart	Humanes Schilddrüsengewebe		Bovines Schilddrüsengewebe	
Gewebemenge	80 mg	95 mg	25 mg	35 mg
Zugegeb. 1-DJT	40,5 µg	40,5 µg	20 µg	20 µg
% J^- ohne Leerwert	24,3 %	13,5 %	26,1 %	28,5 %
Umges. 1-DJT-Menge	9,8 µg	5,6 µg	5,2 µg	5,7 µg
Umges. µg 1-DJT/mg Gewebe	0,122	0,059	0,208	0,162

Die pro mg Schilddrüsengewebe metabolisierten 1-DJT-Quantitäten sind in der Größenordnung der von STANBURY und Mitarbeiter 1958 angegebenen Werte (0,3 µg 1-DJT/mg Gewebe nach 20 Minuten Inkubation). Werden die Ergebnisse graphisch dargestellt, so fällt eine unbekannte Aktivitätsfraktion zwischen dem Jodid und dem 1-DJT-Peak auf.
Nach den Angaben von STANBURY und MORRIS 1958 dürfte es sich hierbei nicht um das Metabolisierungsprodukt 1-MJT handeln.

VIII. Inhibierung der Mikrosomendejodase

Den soeben besprochenen Versuchen mit bovinem Schilddrüsengewebe wurde eine Prüfung der Inhibitionsmöglichkeiten angeschlossen.
ROCHE und Mitarbeiter erwähnen 1953 Monojodessigsäure als starken Inhibitor der Mikrosomendejodase. In dem folgenden Doppelversuch A wurde 0,5 mg Monojodessigsäure (Jodessigsäure p.A. JCH_2COOH der Firma Merck AG, Darmstadt)den oben angegebenen Reagentien zugesetzt. STANBURY gibt, neben anderen Inhibitionsmöglichkeiten der Mikrosomendejodase, ein 2 Minuten langes Erwärmen auf 50°C an. In dem folgenden Doppelversuch B wurde nach dieser Angabe inhibiert. Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie die bei den bovinen Schilddrüsenuntersuchungen im vorigen Kapitel, nur daß vor der Inkubation inhibiert wurde.

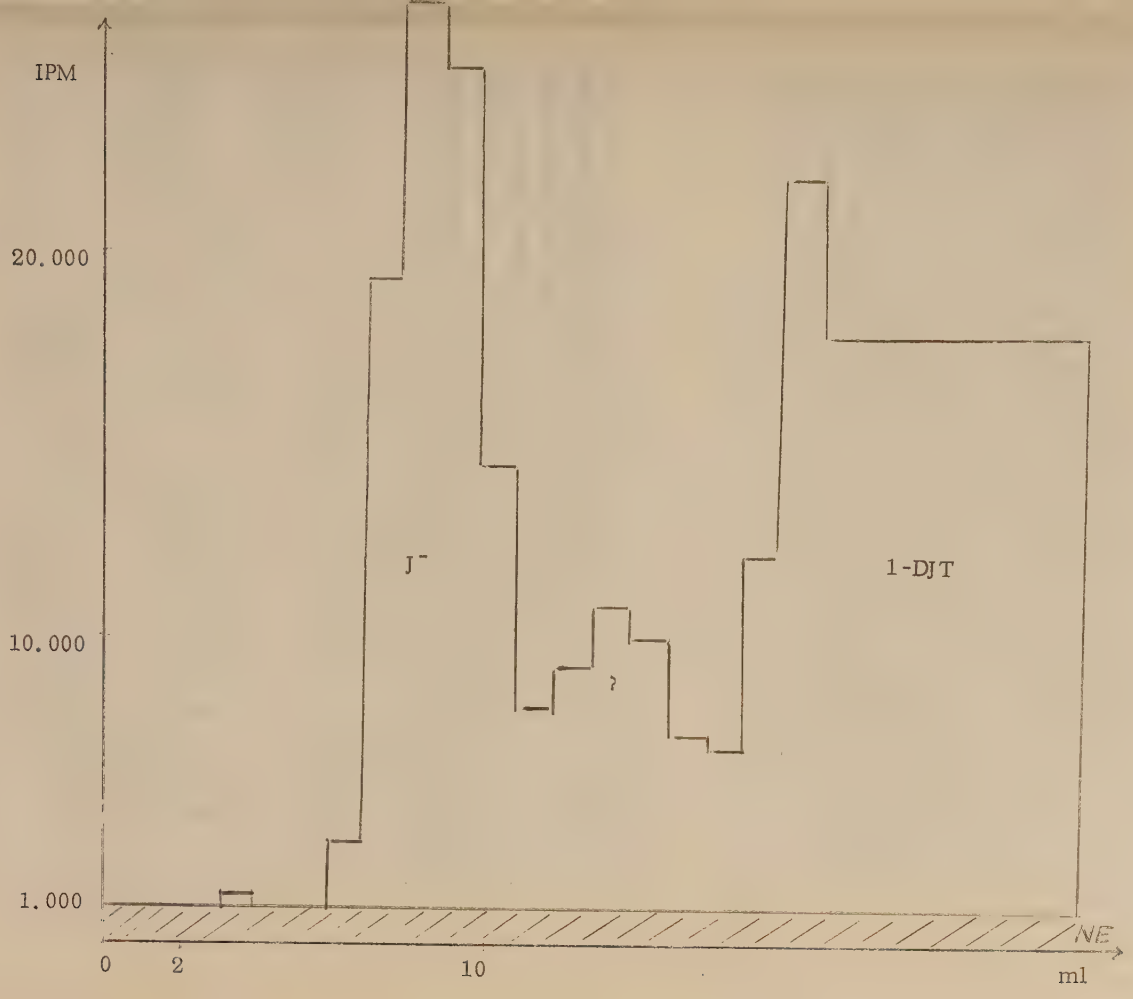

IPM
20.000
10.000
1.000
J⁻
?
1-DJT
NE
0
2
10
ml

Abbildung 13:

Art der Inhibition	A Monojodessigsäure		B 50°C 2 Minuten	
Gewebemenge	40 mg	30 mg	45 mg	35 mg
1-DJT-Menge	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg
% J^- ohne Leerwert	0,3 %	0,53 %	7,5 %	9,5 %

Die Wirkung der Inhibition läßt sich in % angeben, wenn die Ergebnisse aus der vorhergegangenen Untersuchung mit bovinem Schilddrüsengewebe ($\bar{x}$ = 27,4 % nach Abzug des Leerwertes) mit 100 % angesetzt werden. Die trotz Inhibition erfolgte Dejodierung D wäre dann:

$$D\,\% = \frac{100 \cdot (\%\ \text{Jodid nach Abzug des Leerwertes})}{27{,}4}$$

Der Inhibitionseffekt I ist dann in % ausgedrückt:

$$I\,\% = 100\,\% - D\,\%$$

Dann beträgt der Inhibitionseffekt für

A) Monojodessigsäure: 98,4 % (Arithmetisches Mittel)
B) 50°C 2 Minuten: 64 % (Arithmetisches Mittel).

IX. Versuch zur Erfassung von Serumeiweißeinflüssen auf das Verhältnis von 1-DJT zu Jodid

Zur Erfassung von nicht vorauszusehenden Einflüssen seitens des Serumeiweißes auf das 1-DJT/Jodid-Verhältnis, die zu einer Fälschung der Ergebnisse führen würden, wurde folgende Untersuchung angestellt:

A) Bestimmung des Leerwertes Lw,
B) Bestimmung des Wertes N, der folgendermaßen gewonnen wird: Inkubation von 0,5 ml Serum mit 4 µg 1-DJT, wobei aber eine eventuelle Mikrosomendejodase mit 0,1 ml einer 10 %igen Monojod-

essigsäurelösung inhibiert wurde. Diesem Ansatz wurden Zusätze wie NADP und ATP in den unten angegebenen Dosen hinzugefügt.

C) Bestimmung des Wertes M: um eine eventuelle mit Monojodessigsäure nicht inhibierbare Dejodase zu hemmen, wurde durch Erwärmen auf 53°C 3 Minuten lang der Ansatz inhibiert. Hier die Ergebnisse:

ad B) Inhibition mit Monojodessigsäure

Zusatz von 0,3 µMol NADP, 0,15 µMol ATP, 1,0 µMol Glucose. Inkubationszeit: 140 Minuten.

1) Leerwerte Lw_1 = 1,94 % Jodid

$\bar{x}$ = 2,08 % Jodid

Lw_1' = 2,22 % Jodid

Inhibierter Wert N_1 = 2,0 % Jodid

$N - Lw_{\bar{x}}$ = -0,08 %

2) Leerwert Lw_2 = 3,07 %

Inhibierter Wert N_2 = 2,97 %

$N_2 - Lw_2$ = -0,1%

ad C) Inhibition mittels Erwärmen

Zusatz von 0,24 µMol NADP, 0,32 µMol ATP. Inkubationszeit: 130 Minuten.

1) Leerwert Lw_1 = 0,78 % Jodid

Inhibierter Wert M_1 = 1,15 % Jodid

$M_1 - Lw_1$ = + 0,37 %

2) Leerwert Lw_2 = 0,70 %

Inhibierter Wert M_2 = 0,39 %

$M_2 - Lw_2$ = - 0,31 %

Die aus der Inhibition mit Monojodessigsäure resultierenden Differenzen zwischen N und Lw liegen innerhalb der Fehlerbreite (Siehe später). Das Serumeiweiß nimmt also in diesem Falle keinen Einfluß auf das Verhältnis 1-DJT zu Jodid ! Die Differenzen aus C) liegen über der Fehlerbreite, und zwar sowohl im positiven wie im negativen Sinne. Dies als Folge der Eiweißdenaturierung durch das Erwärmen anzunehmen, liegt nahe.

D. DIE VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE

I. Versuchsanordnung bei der Serum- bzw. Plasmauntersuchung

Die Gewinnung von Serum bzw. Plasma wurde schon beschrieben. Dem so gewonnenen Untersuchungsmaterial werden 1-DJT und die vor jedem Versuch mit Konzentrationsangabe erwähnten Beigaben zugegeben, das Ganze im Eppendorf-Rotationsschüttler 10 Minuten gemischt und anschließend während der jeweils angegebenen Zeit inkubiert.
Nach der Inkubation wird das ganze Gemisch auf die Sephadexsäule gegeben und in der oben beschriebenen Weise fraktioniert. Danach folgt die Messung der Radioaktivität in den einzelnen 1 ml Fraktionen.
Jeder Versuch besteht aus dem Leerwert Lw und dem Enzymwert, beide als Doppelwerte angesetzt. Die Enzymwerte wurden mit dem Index A bis Z versehen, die entsprechenden Leerwerte mit dem Index Lw_a bis Lw_z.
Die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen 1 ml Portionen ist in der Abbildung 14 (Seite 42) dargestellt. In allen Versuchen ergibt die graphische Darstellung diesen Typ der Radioaktivitätsverteilung, so daß auf die bildliche Wiedergabe der einzelnen Versuchsergebnisse verzichtet werden kann.

II. Untersuchung auf die von Roche und Mitarbeiter beschriebene Mikrosomendejodase

1. Im Blutserum

Als Cofaktor wurde 0,24 µMol NADP pro Versuch zugesetzt. Die Substratkonzentration wurde in den einzelnen Versuchen von 0,1 µg 1-DJT bis 20,72 µg 1-DJT/ml Serum variiert.

F) Einem ml Serum wurde 0,1 µg 1-DJT zugesetzt. Inkubationszeit 120 Minuten.

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{f1}	2.966	3,07	97.261
Lw_{f2}	3.031	2,97	101.020
f_1	3.060	3,25	92.830
f_2	3.263	3,36	96.845

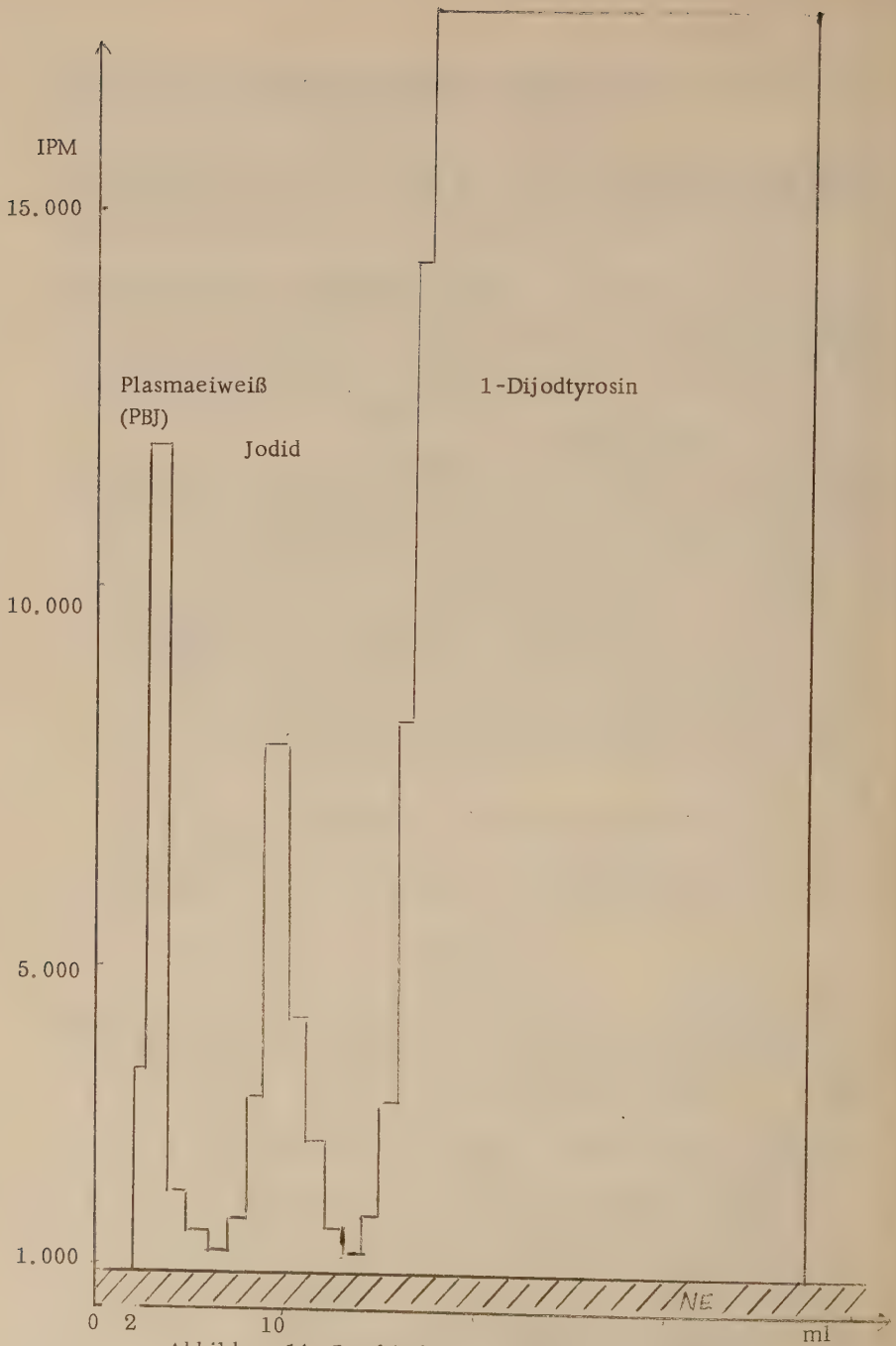


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Radioaktivität in den einzelnen 1 ml Fraktionen

G) Untersucht wurde 0,5 ml Serum. Inkubationszeit 120 Min.
Substratkonzentration: 1,30 µg 1-DJT/ml Serum

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
O_{g1}	3.261	0,78	417.590
O_{g2}	4.609	0,69	666.811
g_1	4.607	0,68	680.031
g_2	4.981	0,65	680.031

H) Untersucht wurde 0,5 ml Serum. Inkubationszeit: 145 Min.
Substratkonzentration: 8,5 µg 1-DJT/ml Serum

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{h1}	2.152	0,94	228,224
Lw_{h2}	2.896	0,71	408.718
h_1	2.295	0,61	378.122
h_2	2.588	0,645	401.260

J) Untersucht wurde 0,5 ml Serum. Inkubationszeit: 105 Min.
Substratkonzentration: 20,7 µg 1-DJT/ml Serum

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{j1}	3.192	0,75	420.404
Lw_{j2}	4.188	1,14	366.600
j_1	3.758	1,06	352.278
j_2	3.492	1,03	338.371

Abbildung 15: Gegenüberstellung der Versuche F, G, H, J

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Serum	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{f1}	-	3,07	3,02		
Lw_{f2}	-	2,97			
f_1	0,1	3,25		3,30	+ 0,28 %
f_2	0,1	3,36			
Lw_{g1}	-	0,78			
Lw_{g2}	-	0,69	0,735		
g_1	1,38	0,65			
g_2	1,22	0,68		0,665	- 0,07 %
Lw_{h1}	-	0,94			
Lw_{h2}	-	0,71	0,825		
h_1	8,50	0,61			
h_2	8,48	0,645		0,627	- 0,198 %
Lw_{j1}	-	0,75			
Lw_{j2}	-	1,14	0,945		
j_1	20,60	1,06			
j_2	20,64	1,03		1,045	+ 0,10 %

P.S.: Herkunft des NADP: das NADP wurde aus der Biochimica Test Combination TC-X-I "Glucose" genommen. Hersteller ist die Firma Boehringer und Söhne GmbH., Mannheim.

2. Im Blutplasma

Als Cofaktor wurde allen Versuchen 0,3 µMol NADP zugesetzt. Die Substratkonzentrationen wurden wie bei der oben beschriebenen Serumuntersuchung gewählt. Die Versuche L, M und N haben einen gemeinsamen Leerwert, da sie an einem Tag ausgeführt wurden.

K) Einem ml Blutplasma wurde 0,1 µg 1-DJT zugesetzt.
Inkubationszeit: 120 Minuten

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{k1}	2.966	3,07	97.261
Lw_{k2}	3.030	2,97	101.021
k_1	2.766	2,81	98.545
k_2	3.032	3,14	95.698

In den Versuchen L, M und N wurde 0,5 ml Blutplasma samt Zusätze 120 Minuten inkubiert. Bei den Leerwerten ist die 1-DJT-Konzentration 9,5 µg/ml Puffer.

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_1	13.680	2,06	662.036
Lw_m	13.332	2,13	625.878
Lw_n	13.216	2,00	663.236

L) Substratkonzentration: 5,5 µg 1-DJT/ml Blutplasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
l_1	14.192	2,09	680.647
l_2	14.442	2,28	634.548

M) Substratkonzentration: 872 µg 1-DJT/ml Blutplasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
m_1	7.392	2,24	330.682
m_2	6.958	2,10	332.208

N) Substratkonzentration: 20,7 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
n_1	7.238	2,34	308.596
n_2	7.428	2,22	331.484

Abbildung 16: Gegenüberstellung der Versuche K, L, M und N

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Plasma	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{k1}	-	3,07			
Lw_{k2}	-	2,97	3,020		
k_1	0,1	2,81			
k_2	0,1	3,14		2,975	- 0,045 %
Lw_1	-	2,06			
Lw_m	-	2,13			
Lw_n	-	2,00	2,095		
l_1	5,5	2,09			
l_2	5,4	2,28		2,185	+ 0,09 %
m_1	8,72	2,24			
m_2	8,72	2,10		2,170	+ 0,075 %
n_1	20,68	2,34			
n_2	20,68	2,22		2,280	+ 0,195 %

III. Untersuchung auf die von HARTMANN beschriebene Zellplasmadejodase

Bei allen im folgenden dargestellten Versuchen wurde 0,5 ml Citratplasma pro Versuch untersucht. Jedem Versuch wurde 35 mg Natriumpyruvat vor der Inkubation zugegeben. Vor der Fraktionierung wurde allen Versuchen 0,05 ml einer 10 %igen Kaliumjodidlösung als Entraineur für die Jodid-Ionen zugesetzt. Die Substratkonzentration variiert zwischen 0,4 µg und 200,4 µg 1-DJT/ml Plasma.

A) Bestimmung des Leerwertes Lw. Substratkonzentration 40,2 µg 1-DJT/ml Puffer

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{b-e1}	318	0,39	76.097
Lw_{b-e2}	288	0,385	74.752

B) Substratkonzentration: 0,4 µg 1-DJT/ml Plasma
Inkubationsdauer: 240 Minuten

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
b_1	384	0,62	62.004
b_2	345	0,48	71.925

C) Substratkonzentration: 10,4 µg 1-DJT/ml Plasma
Inkubationsdauer: 240 Minuten

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
c_1	271	0,35	76.946
c_2	249	0,32	78,799

D) Substratkonzentration: 80,4 µg 1-DJT/ml Plasma
Inkubationsdauer: 240 Minuten

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
d_1	114	0,16	71.700
d_2	133	0,18	73.050

E) Substratkonzentration: 200,4 µg 1-DJT/ml Plasma
Inkubationszeit: 300 Minuten

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
e_1	279	0,37	75.537
e_2	306	0,28	107.811

Abbildung 17: Gegenüberstellung der Versuche B, C, D, E

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Plasma	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{b-e1}	-	0,39			
Lw_{b-e2}	-	0,385	0,387		
b_1	0,4	0,62			
b_2	0,4	0,48		0,55	+ 0,163 %
c_1	10,4	0,35			
c_2	10,4	0,32		0,335	- 0,052 %
d_1	80,4	0,16			
d_2	80,4	0,18		0,17	- 0,217 %
e_1	200,4	0,37			
e_2	200,4	0,28		0,325	- 0,062 %

IV. Untersuchung von Blutplasma mit Flavinmononucleotid und Eisen^{2+}-Ionen als Zusätze

Wie schon erwähnt, beschrieb TATA 1960 eine Thyroxindeshalogenase, die in geringem Maße auch Jodtyrosine deshalogenieren kann. In den folgenden Versuchen wurden 10 µMol FMN (Ribose-5'-Phosphat Mononatriumsalz; bezogen von dem Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) und 6 µMol $FeCl_2$ (aus einer frisch bereiteten 1/100 Molare Lösung) pro ml Plasma zugesetzt. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine 1/10 molare $FeCl_2$-Lösung verwendet, die aber das Plasmaeiweiß ausfällte. So stand für die Wiederholung nur so viel 1-DJT zur Verfügung, daß auf die Doppelwerte verzichtet werden mußte. Die Inkubationszeit betrug 190 Min.

	Jodid IPM	%	Gesamt IPM
V) Substratkonzentration: 0,4 µg 1-DJT/ml Plasma			
	5.004	8,88 %	56,396
W) Substratkonzentration: 40,4 µg 1-DJT/ml Plasma			
	2.884	9.18 %	31.436
X) Substratkonzentration: 100,4 µg 1-DJT/ml Plasma			
	2.322	8,72 %	26.602
Leerwert Lw_{vwx}: Substratkonzentration: 40,4 µg 1-DJT pro ml Pufferlösung			
Lw_{vwx1}	5.282	9,05 %	58.396
Lw_{vwx2}	7.538	9,09 %	82.902

Abbildung 18: Gegenüberstellung der Versuche V, W und X

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Plasma	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{vwx1} Lw_{vwx2}	- -	9,05 9,09	9,07		
v	0,4	8,88		8,88	- 0,19 %
w	40,4	9,18		9,18	+ 0,11 %
x	100,4	8,72		8,72	- 0,35 %

V. Untersuchung von Blutplasma mit Nicotinamid-Adenindinucleotid und Adenosintriphosphat als Zusätze

Wie berichtet, beschrieben KURLAND und Mitarbeiter 1960 eine Thyroxindejodase in Leukozyten. Eine Dejodierung von Jodtyrosinen durch dieses Enzym ist denkbar, etwa in Analogie zu der von TATA beschriebenen Thyroxindeshalogenase. In dieser Versuchsreihe wurden, wie von KURLAND und Mitarbeiter empfohlen, 8 µMol ATP und 5 µMol NADH zu je 0,5 ml Plasma zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 195 Min.

Leerwert Lw_{stu}: Substratkonzentration: 40,4 µg 1-DJT/ml Puffer

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{stu1}	5.282	9,05	58.396
Lw_{stu2}	7.538	9,09	82.902

S) Substratkonzentration: 0,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
s_1	5.984	9,22	64.842
s_2	6.282	9,03	69.582

T) Substratkonzentration: 40,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
t_1	5.910	8,95	66.034
t_2	7.974	9,18	86.706

U) Substratkonzentration: 100,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
u_1	7.134	8,93	79.944
u_2	5.670	9,16	61.952

Abbildung 19: Gegenüberstellung der Versuche S, T und U

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Plasma	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{stu1}	-	9,05			
Lw_{stu2}	-	9,09	9,07		
s_1	0,4	9,22			
s_2	0,4	9,03		9,125	+ 0,055 %
t_1	40,4	8,95			
t_2	40,4	9,18		9,065	- 0,005 %
u_1	100,4	8,93			
u_2	100,4	9,15		9,045	- 0,025 %

P. S.: Herkunft von ATP und NADH. Beide Zusätze wurden von der Firma Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, bezogen. Das ATP stammt aus der Biochimica Test Combination "Glucose" TC-X-I; das NADH aus der Biochemica Test Combination "GOT" Glutamat-Oxalat-Transaminase TC-A-I.

VI. Untersuchung von Blutplasma mit Flavin-Adenin-dinucleotid als Zusatz

Das FAD wurde vom Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen. Je 0,5 ml Blutplasma wurden 4 µMol FAD zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 180 Minuten.

Leerwert Lw_{pqr}: Substratkonzentration 40,4 µg 1-DJT/ml Puffer.

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
Lw_{pqr1}	7.984	9,20	86.744
Lw_{pqr2}	7.794	9,00	86.652

P) Substratkonzentration: 0,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
P_1	3.972	7.49	53.052
P_2	6.706	7,79	86.134

Q) Substratkonzentration: 40,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
q_1	3.710	7,64	48.882
q_2	4.791	7,82	61.222

R) Substratkonzentration: 100,4 µg 1-DJT/ml Plasma

	Jodid		Gesamt IPM
	IPM	%	
r_1	4.678	7,70	60.836
r_2	4.498	9,03	49.670

Abbildung 20: Gegenüberstellung der Versuche P, Q und R

	Substratkonzentration in µg 1-DJT/ml Plasma	% J^-	$\bar{x}_o$	$\bar{x}_y$	Erfolgte Dejodierung $\bar{x}_y - \bar{x}_o$
Lw_{pqr1}	-	9,20			
Lw_{pqr2}	-	9,00	9,10		
p_1	0,4	7,49			
p_2	0,4	7,79		7,64	- 1,46 %
q_1	40,4	7,64			
q_2	40,4	7,82		7,73	- 1,37 %
r_1	100,4	7,70			
r_2	100,4	9,03		7,865	- 1,235 %

VII. Ermittlung der Fehlerbreite

Es wurde die Fehlerbreite für jede Art der Versuchsanordnung bestimmt. Demnach sind folgende Fehlerbreiten bestimmt worden:

a) die Fehlerbreite der Leerwerte,
b) die Fehlerbreite der Untersuchungen mit Serum,
c) die Fehlerbreite der Untersuchungen mit Plasma.

Zur Berechnung der Fehlerbreite wurden die Doppelwerte nach folgendem Schma verwendet:

1. Berechnung des arithmetischen Mittels $\bar{x}$ aus den Differenzen x zwischen den Doppelwertpaaren.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \ldots\ldots x_n}{n}$$

2. Berechnung des scheinbar absoluten Fehlers:

$$\Delta x_1 = x_1 - \bar{x}$$

$$\Delta x_2 = x_2 - \bar{x}$$

$$- \ldots\ldots\ldots\ldots$$

$$\Delta x_n = x_n - \bar{x}$$

3. Berechnung des mittleren Fehlers des Resultats:

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{x^2_1 + x^2_2 + \ldots\ldots x^2_n}{n\,(n-1)}}$$

Art der Untersuchung	$\bar{x}$	ε	Fehlerbreite
Leerwert Lw n = 11	0,167	0,036	$0,167 \pm 0,036$
Serum n = 4	0,051	0,020	$0,051 \pm 0,020$
Plasma n = 14	0,250	0,125	$0,250 \pm 0,125$
aus allen angeführten Werten: n = 29	0,157	0,0767	$0,157 \pm 0,0767$

n = Zahl der Doppelwerte, aus denen die angegebene Fehlerbreite errechnet wurde

Also beträgt die Fehlerbreite aus allen angeführten Versuchen:

$(0,157 \pm 0,0767)$ % Jodid.

VIII. Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde durch Stichproben ermittelt. Das zu untersuchende Material (z. B. Serum + 1-DJT + NADP) wurde vor der Inkubation auf die vorhandene Radioaktivität gemessen. Die wiedergefundene Aktivität wurde durch Addieren der einzelnen Fraktionsradioaktivitäten nach Abzug der Glasleerwerte ermittelt.

Versuch	Lw_{f1}	Lw_{f2}	f_1	f_2	k_1	k_2
IPM vor Trennung	89.182	88.762	89.036	80.351	88.633	89.110
Gesamt IPM nach Trennung	97.261	101.020	92.830	96.856	98.545	95.700
Wiederfindung	109%	111,4%	104%	108%	111%	107%

Das arithmetische Mittel aus diesen sechs Werten beträgt:

$$\bar{x} = 108\ \%.$$

Bei der Suche nach der Ursache für diese zu hohe Wiederfindung stellte sich heraus, daß die Einheitenzählröhre des Scintillationszählers ab 80.000 IPM einen Impulsdefizit aufwies. Bei 100.000 IPM liegt der Verlust bei 8,5 %. Wird dieser Faktor berücksichtigt, so liegt die Wiederfindung bei 99 % - 100 %.

BESPRECHUNG

Es wurde in dieser Arbeit die Frage gestellt, ob es eine extrazelluläre Dejodase in dem enzymreichen Blutplasma gibt. Es ist bekannt, daß jodhaltige Abbauprodukte der Schilddrüsenhormone wie die Jodtyrosine im peripheren Blut kreisen.

Wie TONG und Mitarbeiter 1954 zeigten, werden intravenös gegebene 1-DJT-Gaben (40 - 50 µCi) sehr schnell abgebaut (90 % der Dosis nach 20 Minuten). Somit ist es wichtig zu wissen, ob diese jodhaltigen Metaboliten unter anderem auch durch frei im Blut kreisende Jodtyrosindejodasen deshalogeniert werden und dadurch ein Beitrag zur Jodeinsparung erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnte keine derartige dejodierende Aktivität nachgewiesen werden.
In den Vorversuchen wurde die Leistungsfähigkeit der Versuchsanordnung dargestellt. Auf Anhieb wurden Dejodierungsergebnisse in der Größenordnung der Resultate von STANBURY und Mitarbeiter 1954 erhalten. Die methodische Fehlerbreite ist mit $< 0,5$ % gering. Jede Dejodierungsaktivität, die mehr als 1 % 1-DJT umgesetzt hätte, wäre sofort aufgefallen. Da die kleinsten verwendeten Substratkonzentrationen bei 0,4 µg lagen, hätte sich eine Umsetzung von 0,004 µg 1-DJT/ml Plasma sicher bemerkbar gemacht.

Eine Affinität von Plasmaeiweiß zu Jodid-Ionen in einem Umfang, der die Ergebnisse verfälscht hätte, ist nach den Angaben von HARTMANN 1956, SCRIBA et al. 1966 und PERLMAN und EDELHOCH 1967 sowie nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen nicht zu erwarten. Es ist, wie bei der Ermittlung der Leerwerte festgestellt wurde, immer genügend freies Jodid von vornherein vorhanden (von ca. 0,009 - 0,15 µg Jodid), um die geringe Jodbindungskapazität der Plasmaeiweißkörper zu sättigen ($< 0,006$ µg J^-/ml Plasma). Eine zusätzliche Beigabe von Jodid schien nicht angebracht, weil sich ein unphysiologisch hoher Jodidspiegel ungünstig auf die Aktivität einer eventuellen Dejodase auswirken würde.
Da TONG und Mitarbeiter 1954 eine Affinität des Jodtyrosins zu Serumeiweiß beschrieben und in eigenen Versuchen eine solche dargestellt werden konnte, kann die Radioaktivität der Plasmaeiweißfraktion zu recht als 1-DJT-Aktivität betrachtet werden, dem PBJ entsprechend.
Daß Jodid in der Sephadexmasse zurückgehalten wird, konnte durch Messungen der Sephadexaktivität nach Fraktionieren von hohen Dosen Jodid 131 ausgeschlossen werden. Auch die gute Wiederfindung (um 100 %)

spricht gegen einen Verlust von Radioaktivität in einem Maße, das die Ergebnisse verfälscht hätte.
Es wurden in dieser Arbeit Substratkonzentrationen von je nach Versuchsreihe 0,1 bzw. 0,4 bis 20 bzw. 200 µg 1-DJT/ml Plasma untersucht. Die gewählten Maximalkonzentrationen dürften ausreichen, um auch bei hoher Michaeliskonstante (und geringer Enzym-Substrat-Affinität) eine Halbsättigung zu erzielen. Eine höhere 1-DJT-Konzentration übersteigt sicher in unphysiologischerweise die normale Plasmakonzentration dieses Metaboliten.
FLETCHER und Mitarbeiter gaben 1958 an, die optimale 1-DJ^{131}T-Menge für den Dijodtyrosintest betrage 25 bis 50 µCi. Bei Annahme des hier üblichen Verhältnisses von 1 mCi pro mg 1-DJT ergibt sich umgerechnet auf 3 Liter Plasma (einen Hämatokrit von 40 % angenommen) eine 1-DJT-Konzentration von 0,01-0,02 µg 1-DJT/ml Plasma. Diese liegt um das 5- bzw. 40fache unter den Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Wie dargestellt, konnten aber aus technischen Gründen die hier untersuchten Minimalkonzentrationen nicht unterschritten werden.
Zur Bestimmung der Mikrosomendejodase arbeiteten STANBURY und Mitarbeiter 1958 mit einer Substratmenge von umgerechnet 0,04 bis 0,14 µg 1-DJT/mg Schilddrüsengewebe. KUSAKABE und MIYAKE verwendeten 1963 0,004 - 0,009 µg 1-DJT/mg Schilddrüsengewebe. In der in den Vorversuchen beschriebenen Untersuchung von bovinem Schilddrüsengewebe wurde 1 µg 1-DJT/mg Gewebe mit gutem Erfolg zugesetzt. HARTMANN gibt 1955 als Substratoptimum bei der Untersuchung der Zellplasmadejodase 0,75 µg 1-DJT/mg Gewebe an. Obwohl es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchtem Plasma nicht um ein Gewebe, sondern um eine Flüssigkeit mit 7 g% Eiweiß handelt, ergeben die in den Versuchen verwendeten Substratkonzentrationen bei Umrechnung auf ein mg Eiweiß Werte, die mit denen in den eben angeführten Veröffentlichungen verglichen werden können. Auf 1 mg Plasmaprotein umgerechnet sind die kleinsten Substratmengen 0,0014 bis 0,0056 µg 1-DJT pro mg Eiweiß. Die maximale Substratmenge beträgt dann 0,28 bis 2,8 µg 1-DJT/mg Plasmaeiweiß.

Als Conenzyme wurden NADH, NADP, ATP, FMN und FAD zugesetzt. Da ein Teil dieser Coenzyme (NADP, ATP, NADH, FMN) als Cofaktoren von Dejodasen bekannt sind, wurden diese in den in der Literatur angegebenen Quantitäten zugesetzt. Auch die in den Veröffentlichungen angeführten Aktivatoren, die Ferro-Ionen und Natriumpyruvat, zeigten keine Wirkung. Es ist anzunehmen, daß neben den im Blutplasma vorkommenden Enzymen auch in geringer Menge die entsprechenden Coenzyme vor-

handen sind. Es liegt daher nahe, daß - auch ohne Zugabe des entsprechenden Cofaktors - eine eventuelle Dejodase sich manifestiert. Um die für diese Annahme erforderliche Frische des untersuchten Materials zu gewährleisten, wurde immer darauf geachtet, daß vom Augenblick der Venenpunktion bis zum Inkubationsbeginn nicht mehr als 30 Minuten verstrichen.

Die Inkubationszeiten wurden reichlich bemessen (von 2 bis 5 Stunden). Die in den Veröffentlichungen angegebenen Inkubationszeiten liegen zwischen 20 Minuten und 5 Stunden. Längere Inkubationszeiten sind nicht angebracht, erstens wegen der geringen Halbwertzeiten der beschriebenen Dejodasen, zweitens wegen der Gefahr von Artefakten durch eine Bakterientätigkeit.

Die Wahl des physiologischen Serum-pH von 7,4 zu Versuchszwecken ist sicher berechtigt. Daß trotz Phosphatpuffer eine geringe Verschiebung des pH in das Basische zu erwarten ist (Ursache ist das Abdampfen des gelösten Kohlendioxyds), wurde in Kauf genommen. Diese geringe pH-Steigerung dürfte keine entscheidende Rolle gespielt haben. Eine Untersuchung über das Auftreten des Metaboliten 1-MJT wurde nicht angestellt. Es konnte auch nicht festgestellt werden, ob das 1-MJT mit der hier angewandten Arbeitsmethode erfaßt werden kann. Ebenso verhält es sich mit dem 1950 von HARTMANN beschriebenen Desaminierungsprodukts Dijodparahydroxyphenylbrenztraubensäure.
In der Veröffentlichung von STANBURY und MORRIS 1958 wurde dargestellt, daß bei der Metabolisierung von 1-DJT durch eine Mikrosomendejodase kein 1-MJT in größeren Quantitäten anfällt, da dieses von dem genannten Enzym schneller umgesetzt wird als das 1-DJT. Die in den Vorversuchen mit Schilddrüsengewebe erhaltene Radioaktivität zwischen der Jodid- und der 1-DJT-Fraktion ist somit nicht unbedingt mit 1-MJT zu identifizieren. In den Untersuchungen mit Plasma konnte nie eine Radioaktivität zwischen Jodid- und 1-DJT-Fraktion gefunden werden. Die Jodprotein-, Jodid-, und 1-DJT-Fraktionen waren immer deutlich voneinander getrennt. Dadurch ließ sich der prozentuale Anteil der Jodidfraktion immer mit Genauigkeit bestimmen; das Auftreten jedes dejodierten Zwischenproduktes hätte sich als Anstieg dieser Jodidfraktion bemerkbar gemacht, da das frei gewordene Jod hier erscheinen muß. Somit ist in der hier angewandten Methode nur die genaue Bestimmung der Jodidfraktion und deren Vergleich mit dem Leerwert erforderlich, um eine genaue Aussage über eine erfolgte Dejodierung zu erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG

Die für den Jodhaushalt wichtige Frage, ob es eine aktive extrazelluläre Jodtyrosindejodase im Blutplasma gibt, wurde untersucht.
Es wurden verschiedene, mit Jod^{125} markierte, 1-Dijodtyrosinkonzentrationen unter Zugabe von NADH, NADP, ATP, FMN, FAD, Ferro-Ionen und Natriumpyruvat als Cofaktoren inkubiert und auf einen Anstieg der Jodidfraktion untersucht. Ein solcher Anstieg hätte auf eine Metabolisierung des Substrates 1-DJT durch eine Jodtyrosindejodase hingewiesen. Diese Untersuchungen wurden mittels Gelfiltration durch Sephadex G 25 Fine durchgeführt. Das in 1 ml Fraktionen gesammelte Eluat wurde anschließend auf den Gehalt an Radioaktivität in einen Bohrlochkristallscintillationszähler untersucht.

In der Diskussion wurden Versuchsanordnung und mögliche Fehlerquellen kritisch besprochen.

In dieser Arbeit konnte bei den zugegebenen Substratmengen und Cofaktoren keine dejodierende Aktivität im Serum oder Plasma nachgewiesen werden. Es bleibt offen, ob bei noch niedrigeren Substratkonzentrationen oder ob mit anderen, hier nicht untersuchten Coenzymen, sich eine extrazelluläre Jodtyrosindejodase nachweisen läßt.

LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT, A., KEATING, F.R.:
Metabolic Studies with I^{131} Labeled Compounds: Distribution and Execution of Radioiodotyrosine in Human Beings.
J. Clin. Endocrin. II, 996 (1951)

Annotations: The Lancet II, 1035 (1956)

BLUM, F., LEISTNER, W., VOIGT, G.:
Schweiz. med. Wschr. 1941, II, 811-836

BAMATTER, F., MEGEVAND, A.:
Les hypothyroidies. Rapports du XVIII ème congrès de l'association des pédiatres de langue française. 1961. S. Karger, Bâle (Suisse)

BASTOMSKY, C.H., ROSENBERG, I.N.:
Inhibition of Thyroidal Deiodination of Diiodotyrosine by Compunds which Enchance NADPH Oxidation.
Endocrinology 79 : 505-510, Sept. 66

CAMERON, C.: Normal and Abnormal Diiodotyrosine Metabolism in Human Subjects.
Biochem. J. 74, 323 (1960)

CHOUFOER, J.C., KASSENAAR, A.A.H., QUERIDO, A.:
Syndrome of Congenital Hypothyroidism with Defective Deshalogenisation of Iodotyrosines.
J. Clin. Endocrin. 20, 983 (1960)

D'ANS, J., LAX, E.: Taschenbuch für Chemiker und Physiker.
Springer-Verlag

DORFF, J.B.: Amer. J. Dis. Child. 48, 1316 (1934)

DUNN, J.T., WERNER, C.: Metabolism of l-Thyroxine in Man.
J. Clin. Endocrin. 24, 460 (1964)

FORSTER, GUTTMANN: J. Biol. Chem. 87, 289 (1930)

GALTON, V.A., INGBAR, S.H.:
The Influence of Reserpine, Serotonine and Metabolites of Tryptophane on the Degradation of Thyroxine and its Derivates.
Endocrinology 68, 435 (1961)

GALTON, V.A., INGBAR, S.H.:
Endocrinology 70, 622 (1962)

HARRINGTON, SALTER: Biochem. J. 24, 464 (1930)

HARTMANN, N.: Dissertation der Univ. Greifswald, 1944

HARTMANN, N.: Über den Abbau von Dijodtyrosin im Gewebe.
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 285, 1 (1950)

HARTMANN, N.: Über Wirkungsbedingungen der Leber im Jodstoffwechsel.
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 301, 60 (1955)

HARTMANN, N.: Intrazelluläre Verteilung der "Dejodase".
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 306, 107 (1956)

HARTMANN, N.: Anreicherung der "Dejodase".
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 308, 157 (1957)

HARTMANN, N.: Kinetik der Leberplasmadejodase.
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 316, 199 (1959)

HEPPEL, L.A., PORTERFIELD, V.P.:
J. Biol. Chem. 176, 763 (1948)

HUBBLE, D.: Familial Cretinism.
The Lancet 1112 (1953)

HUTCHINSON, J.H., Mc GIRR, E.M.:
J. Clin. Endocrin. 14, 869 (1954)

HUTCHINSON, J.H., Mc GIRR:
Sporadic non Endemic Goitrous cretinism.
The Lancet I, 1035 (1956)

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

KUSAKABE, T., MIYAKE, T.:
Definitive Deiodination of Labeled 1-DJT in Patient with Simple Goiter.
J. Clin. Endocrin. 23, 132 (1963)

KUSAKABE, T., MIYAKE, T.:
Thyroidal Deiodination Defect in 3 Sisters with Simple Goiter.
J. Clin. Endocrin. 24, 456 (1964)

KURLAND, G.S., KROTKOV, M.v., FREEDBERG, A.S.:
Oxygen Consumption and Thyroxine Deiodination by human Leucocytes.
J. Clin. Endocrin. 20, 35 (1960)

Leading Articles, The Lancet 2, 611 (1956)

MAAYAN, M.L., ROSENBERG, I.N.:
Effect of Injection of Thyrotropin upon deiodination of 1-DJT by Rat Liver and Thyroid.
Endocrinology 73, 38 (1963)

Mc GIRR, E.M., HUTCHINSON, J.H.:
Radioactive Iodine Studies in non Endemic Goitrous Cretinism.
The Lancet I, 1117 (1953)

Mc GIRR, E.M., HUTCHINSON, J.H.:
Sporadic Cretinism with Goiter.
The Lancet I, 106 (1956 a)

Mc GIRR, E.M., HUTCHINSON, J.H., CLEMENT, W.E.:
Sporadic non Endemic Goitrous Cretinism: Identification and Significance of 1-MJT and 1-DJT in Serum and Urine.
The Lancet 2, 906 (1956 b)

Mc GIRR, E.M., HUTCHINSON, J.H., CLEMENT, W.E.:
Sporadic Goitrous Cretinism: Deshalogenase Deficiency in the Thyroid Gland of a Goitrous Cretin and on Heterozygotes Carriers.
The Lancet 2, 823 (1959)

MICHEL, R.: Aufsatz in Bamatter, F., A. Mégevand, Seite 17. Siehe unter Bamatter.

PERLMAN, R.L., EDELHOCH, H.:
The Formation of Diiodityrosine in Iodinated Human Serum Albumin.
J. Biol. Chem. 242, 2416-22 (May 1967)

QUERIDO, A., STANBURY, J.B., KASSENAAR, A.A.H., MEIJER, J.W.A.:
The Metabolism of Iodotyrosines III: Diiodotyrosine Deshalogenisation Activity of Human Thyroid Tissue.
J. Clin. Endocrin. 16, 1096 (1956)

RALL, E.: J. Clin. Endocrin. 10, 1996 (1950)

ROCHE, J., MICHEL, R., MICHEL, O., LISSITZKY, S.:
Sur la deshalogénisation enzymatique des iodotyrosines par le corps thyroide et sur son rôle physiologique.
Biochim. et Biophys. Acta 9, 161 (1952)

ROCHE, J., MICHEL, R., MICHEL, O., LISSITZKY, S.:
Sur la deshalogénisation enzymatique des iodotyrosines par le corps thyroide et sur son rôle physiologique.
Biochim. et Biophys. Acta 12, 570 (1953)

SCHÄFER, H., VOSS, C., HENSCHEL, H.J.:
Jodtyrosine im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone.
Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 341, 268 (1965)

SCHLOSSBERGER: modifiziert aus Mougdal, N.R., Ramachandran, L.K., Sarma, P.S.: The Colorimetric Determination of 3:5-1-DJT. Univ. Biochem. Laborat. Madras Analysist (Lond.) 79,43-46 (1954)

SCRIBA, P.C., LANDGRAF, R., HEINZE, G.H., SCHWARZ, K.:
Bestimmung der Bindung von T_3 an Serumproteine mittels Dextran-Gel-Filtration.
Klinische Wschr. 44, 2. Heft, S. 69-76 (1966)

STANBURY, J.B., KASSENAAR, A.A.H., MEIJDER, J.W.A., TERPSTRA, J.:
The Occurrence of 1-MJT and 1-DJT in the Blood of a Patient with Congenital Goiter.
J. Clin. Endocrin. 15, 1216 (1955 a)

STANBURY, J.B., OHELA, K., PITT RIVERS, R.:
Metabolism of Iodine in Goitrous Cretins and in 2 Patients Receiving Methimazole.
J. Clin. Endocrin. 15, 54 (1955 b)

STANBURY, J.B., HEDGE, A.N.:
A Study of a Family of Goitrous Cretins.
J. Clin. Endocrin. 10, 1471 (1950)

STANBURY, J.B., KASSENAAR, A.A.H., MEIJER, J.W.A.:
The Metabolism of Iodotyrosines I. The Fate of 1-MJT and 1-DJT in Normal Subjects and in Patients with various Diseases.
J. Clin. Endocrin. 16, 735 (1956 a)

STANBURY, J.B., MEIJER, J.W.A., KASSENAAR, A.A.H.:
The Metabolism of Iodotyrosines II. The Metabolism of 1-MJT and 1-DJT in certain Patients with Familial Goiter.
J. Clin. Endocrin. 16, 848 (1956 b)

STANBURY, J.B., LITVAK, J.:
The Metabolism of Iodotyrosines IV. Metabolism of 1-DJT in Patients with Hypothyroidism.
J. Clin. Endocrin. 17, 654 (1957 a)

STANBURY, J.B.: The Requirement of 1-MJT Deiodinase for Triphosphopyridine Nucleotide.
J. Biol. Chem. 228, 801 (1957 b)

STANBURY, J.B.: The Capacity of Normal Man to Deiodinate Iodotyrosine.
Acta Endocrin. KBH 29, 307 (1958 a)

STANBURY, J.B., MORRIS, M.L.:
Deiodination of 1-DJT by Cell free Systems.
J. Biol. Chem. 233, 106 (1958 b)

STANBURY, J.B., QUERIDO, A.:
Genetic and Environmental Factors of Cretinism. A Classification.
J. Biol. Chem. 233, 158 (1958)

TATA, I.R.: The Partial Purification and Properties of Thyroxine Deshalogenase.
Biochem. J. 77, 214 (1960)

TONG, W., TAUROG, A., CHAIKOFF, J.L.: Non
Thyroglobuline Iodine of the Thyroid Gland,
J. Biol. Chem. 191, 665 (1951)

TONG, W., TAUROG, A., CHAIKOFF, J.L.:
The Metabolism of J 131 Labeled 1-DJT
J. Biol. Chem. 207, 59 (1954

LEBENSLAUF

Am 6. Juni 1942 wurde ich als Sohn des 1945 verstorbenen Dr. jur. Maximilian Freiherr du Prel und seiner Gemahlin Ilse Rose, geborene von Breitenbuch, in Berlin geboren.
Von 1949 bis 1953 besuchte ich die école communale Jules Ferry, von 1953 bis 1956 das lycée Jean-Jacques Rousseau, beide Schulen in Montmorency bei Paris.
1956 wurde ich in das Hermann Hesse Gymnasium in Calw/Württ. umgeschult, wo ich die deutsche Sprache erlernte und im April 1961 das Zeugnis der Reife erhielt.

Seit dem Sommersemester 1961 studierte ich an der hiesigen Ludwig-Maximilians-Universität. Nach einem Semester Naturwissenschaften entschied ich mich für das Medizinstudium und legte die ärztliche Vorprüfung im Sommersemester 1964 sowie die ärztliche Prüfung am 20. Dezember 1967 ab.

Im Jahre 1963 heiratete ich die Studentin der Medizin Gesa Tjaden. Bis zum Abschluß meines Studiums wurde ich dreifacher Vater - zweier Jungens und eines Mädchens.